

**BESTIMMUNG VON METABOLITEN IM CYTOSOLISCHEN UND
MITOCHONDRIALEN RAUM ISOLIERTER LEBERZELLEN ALS
BEITRAG ZUM VERSTÄNDNIS DER REGULATION VON
KETOGENESE UND GLUKONEOGENESE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Dietrich Brocks
aus Kiel

1979

BESTIMMUNG VON METABOLITEN IM CYTOSOLISCHEN UND
MITOCHONDRIALEN RAUM ISOLIERTER LEBERZELLEN ALS
BEITRAG ZUM VERSTÄNDNIS DER REGULATION VON
KETOGENESE UND GLUKONEOGENESE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Dietrich Brocks

aus

Kiel

1979

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Wieland
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 26.7.1979



Die vorliegende Arbeit wurde von September 1976 bis Dezember 1978 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. O. Wieland in der Forschergruppe Diabetes, München durchgeführt.

Herrn Professor Wieland gilt mein herzlicher Dank für sein stetes Interesse und die Unterstützung, die er mir und dieser Arbeit zuteil werden ließ.

Herrn Dr. E. Siess schulde ich besonderen Dank für seine vielfachen Anregungen und eingehenden Diskussionen.

Den Assistentinnen der Arbeitsgruppe Siess, die durch ihre Mitarbeit zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, möchte ich meinen Dank aussprechen.

Frau H. Kuhn danke ich für die Anfertigung der Zeichnungen und Abbildungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
ERGEBNISSE	6
1. Gesamtzelluläre Metabolitgehalte und Stoffwechselleistungen isolierter Leberzellen	6
2. Validität der Digitonin Methode	10
3. Substrateffekte auf die subzelluläre Metabolitverteilung in isolierten Leberzellen gefütterter Ratten	16
3.1. Mitochondriale Veränderungen	16
3.2. Metabolitveränderungen im Cytosol	18
4. Einfluß von Glucagon auf Stoffwechselleistungen und Metabolitverteilung in isolierten Leberzellen gehungerter Ratten	21
4.1. Veränderungen der Stoffwechselleistungen isolierter Leberzellen durch Glucagon	21
4.2. Einfluß von Glucagon auf Metabolite im Cytosol	24
4.3. Einfluß von Glucagon auf Metabolite im mitochondrialen Raum	26
5. Abhängigkeit der Glucagonwirkungen von der Glucagonkonzentration	29
6. Ketonkörperbildung isolierter Leberzellen nach Glucagoninjektion in vivo	29
7. Wirkung von cyclo-AMP auf Stoffwechselleistungen und Metabolitkompartimentierung isolierter Hepatozyten in Gegenwart von Laktat	33
7.1. Effekt des cyclo-AMP auf Glukoneogenese und Ketonkörperbildung isolierter Hepatozyten	33
7.2. Veränderungen der cytosolischen Metabolite von Hepatozyten 48 Stunden gehungerter Ratten durch cyclo-AMP	33

7.3. Veränderungen der mitochondrialen Metabolite von Hepatozyten 48 Stunden gehungerter Ratten durch cyclo-AMP	36
8. Zeitabhängigkeit der Glucagon- und cyclo-AMP-Effekte	36
9. Glucagon-Effekte im Biotinmangel	40
9.1. Wirkung einer Biotinmangel-Diät auf die Leber-Pyruvatcarboxylase	40
9.2. Wirkung von Glucagon auf die Glukoneogenese aus Laktat bzw. Glutamin im Biotinmangel	42
9.3. Glucagonwirkung auf die Ketogenese in Hepatozyten aus Biotinmangelratten	45
9.4. Wirkung des Glucagon auf zelluläre und mitochondriale Metabolitgehalte von Hepatozyten aus Biotinmangelratten	47
9.5. Glucagonwirkung auf die Glukoneogenese aus Dihydroxyaceton oder Fruktose im Biotinmangel	49
10. Effekte von Oleat auf Stoffwechselleistungen und die subzelluläre Metabolitverteilung isolierter Hepatozyten 48 Stunden gehungerter Ratten	51
10.1. Oleateffekte auf Stoffwechselleistungen und Metabolitkompartimentierung in Hepatozyten in Gegenwart von Laktat	55
10.2. Differenzierung der Wirkung von Oleat und Glucagon auf Glukoneogenese, Ketogenese und zelluläre Metabolitgehalte von Hepatozyten in Gegenwart von Laktat	56
10.3. Differenzierung der Wirkung von Oleat und Glucagon auf Glukoneogenese und Ketogenese isolierter Hepatozyten in Gegenwart von Glutamin	59
10.4. Oleatwirkungen in Hepatozyten aus Biotinmangelratten	62
11. Vergleich der Wirkungen verschiedener Hormone auf Stoffwechselleistungen und Metabolitkompartimentierung isolierter Hepatozyten	65

DISKUSSION	70
Validität der Digitonin Methode	70
Metabolitkonzentrationen in Mitochondrien und Cytosol isolierter Hepatozyten gefütterter Ratten	76
pH-Differenz über die Mitochondrienmembran	81
Regulation der Ketonkörperbildung	85
Glucagoneffekt auf die subzelluläre Metabolitverteilung	93
Zum Mechanismus der Glucagonwirkung	
Unterschiede zur Wirkung von Fettsäuren	94
Zum Mechanismus der Oleatwirkung	96
Ort(e) der Glucagonwirkung	
Mitochondriale Wirkungen	97
Extramitochondriale Wirkungen des Glucagons	100
Einfluß von Glucagon auf den Redoxstatus der cytosolischen und mitochondrialen Pyridin-nukleotide	102
Dosis-Wirkungsbeziehungen	105
Experimente mit Biotinmangel-Hepatozyten	106
Wirkungen anderer Hormone auf die Metabolit-kompartimentierung in Leberzellen	106

EXPERIMENTELLER TEIL

M a t e r i a l i e n

1. Geräte	109
2. Chemikalien	110
2.1. Anorganische und organische Chemikalien	110
2.2. Radiochemikalien	111
2.3. Biochemikalien	111
3. Tiermaterial	112

3.1. Standarddiät	112
3.2. Biotinmangeldiät	112

M e t h o d e n

1. Szintillationsflüssigkeit	113
2. Herstellung von 4- ¹⁴ C-Oxalacetat	113
3. Herstellung fettfreien Albumins	114
4. Herstellung einer 20 mM Oleat-Lösung	114
5. Herstellung von Ca-Phosphat-Gel	115
6. Anreicherung von Laktatdehydrogenase aus Hefe	115
7. Krebs-Henseleit Puffer	116
8. Präparation isolierter Leberzellen	117
9. Inkubation der Zellen	118
9.1. Ansatz für Kompartimentierungsexperimente	118
9.2. Ansatz für Glukoneogenese Experimente	118
10. Zellfraktionierung	119
10.1. Herstellung der Gesamtzellextrakte	119
10.2. Digitonin Methode	119
10.3. Verschleppungsexperimente	120
10.4. Herstellung der Extrakte zur Bestimmung der Ketonkörper- und Glukoseproduktion	120
11. Analytische Methoden	120
11.1. Oxalacetatbestimmung	120
11.2. Acetyl-CoAbestimmung	121
11.3. Bestimmung des molaren Extinktions- koeffizienten von NADH bei 340 nm am Doppelstrahlspektrophotometer	122
11.4. Adenosindiphosphatbestimmung	123
11.5. Adenosinmonophosphatbestimmung	124
11.6. Aspartatbestimmung	125
11.7. Citratbestimmung	125
11.8. Coenzym A-Bestimmung	126
11.9. Glukose-6-Phosphatbestimmung	127
11.10. Glutamatbestimmung	128
11.11. Glutaminbestimmung	128
11.12. Malatbestimmung	129

11.13. 2-Oxoglutaratbestimmung	130
11.14. Phosphoenolpyruvatbestimmung	130
11.15. Pyruvatbestimmung	131
11.16. 3-Phosphoglyceratbestimmung	132
11.17. Acetoacetatbestimmung	133
11.18. Adenosintriphosphatbestimmung	133
11.19. Glukosebestimmung	134
11.20. Harnstoffbestimmung	135
11.21. 3-Hydroxybutyratbestimmung	136
11.22. Laktatbestimmung	136
11.23. Triglyceridbestimmung	137
11.24. Bestimmung der Pyruvatcarboxylase- aktivität	139
11.24.1. Extraktion der Pyruvatcarboxy- lase	139
11.24.1.1. Extraktion aus Lebergewebe	139
11.24.1.2. Extraktion aus Leberzellen	139
11.24.2. Pyruvatcarboxylasebestimmung	139
12. Berechnung der Metabolitkonzentrationen	140
 ZUSAMMENFASSUNG	 142
 LITERATURVERZEICHNIS	 146
 LEBENS LAUF	 160

ABKÜRZUNGEN

AcCoA	Acetyl-Coenzym A
AcAc	Acetoacetat
ADP	Adenosin 5'-diphosphat
AMP	Adenosin 5'-monophosphat
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
Bis-MSB	p-bis-(o-Methylstyryl)-Benzol
cyclo-AMP	Adenosin 3'5'-monophosphat zyklisch
Ci	Curie
CoA, CoASH	Coenzym A
cyt	cytosolisch
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Einheit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
3-HOB	3-Hydroxybutyrat
Ipm	Impulse pro Minute
KHB	Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer
KHB-G	Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer mit 1,5% Gelatine
mit	mitochondrial
m/c	Konzentrationsverhältnis mitochondrial/ cytosolisch
NAD ⁺ , NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, oxydierte und reduzierte Form
NADP ⁺ , NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, oxydierte und reduzierte Form
PEP	Phosphoenolpyruvat
PPO	2,5-Diphenyloxazol
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
TG	Trockengewicht
Tram	Triethanolamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

VII

ENZYME

Acetyl-CoA Carboxylase EC 6.4.1.2
Alanin Aminotransferase EC 2.6.1.2
Aspartat Aminotransferase AAT EC 2.6.1.1
Citrat Lyase CL EC 4.1.3.6
Citratsynthase EC 4.1.3.7
Collagenase EC 3.4.24.3.
Fructose-1,6-bisphosphatase EC 3.1.3.11
Glukose-6-phosphatdehydrogenase G6PDH EC 3.1.3.9
Glutamatdehydrogenase GluDH EC 1.4.1.3
Glutaminase EC 3.5.1.2
Glyceraldehydphosphatdehydrogenase GAPDH EC 1.2.1.12
Glycerolphosphatdehydrogenase GDH EC 1.1.1.8
Glycerokinase EC 2.7.1.30
Hexokinase HK⁻ EC 2.7.1.1
3-Hydroxybutyratdehydrogenase EC 1.1.1.30
Laktatdehydrogenase EC 1.1.1.27
Laktatdehydrogenase aus Hefe EC 1.1.2.3
Malatdehydrogenase EC 1.1.1.37
Malic Enzyme EC 1.1.1.40
Myokinase MK EC 2.7.4.3
2-Oxoglutaratdehydrogenase EC 1.2.4.2
Phosphodiesterase EC 3.1.4.17
Phosphofruktokinase EC 2.7.1.11
Phosphoenolpyruvatcarboxykinase EC 4.1.1.32
3-Phosphoglyceratkinase PGK EC 2.7.2.3
Phosphotransacetylase EC 2.3.1.8
Pyruvatcarboxylase PC EC 6.4.1.1
Pyruvatdehydrogenase PDH EC 1.2.4.1
Pyruvatkinase EC 2.7.1.40
Trioseisomerase TIM EC 5.3.1.1
Urease EC 3.5.1.5

EINLEITUNG

Ein unkontrolliertes Nebeneinander anaboler und kataboler Stoffwechselprozesse würde zu einer Vergeudung von Energie und Zellsubstanz führen. Eine Koordinierung der Stoffwechselwege, die ein Metabolit beim Auf- und Abbau durchläuft, ist deshalb lebensnotwendig. Die Natur hat die Probleme einer solchen Kontrolle des Stoffwechsels auf vielfache Weise gelöst. Eine davon ist die Unterteilung der Zelle in verschiedene Stoffwechselräume, in denen Synthese- und Abbauvorgänge gleichzeitig, aber voneinander getrennt ablaufen können.

In der Leberzelle sind für die Koordination des Intermediärstoffwechsels insbesondere zwei Räume von Bedeutung, die Mitochondrienmatrix und das Cytosol. Diese sind durch die Mitochondrieninnenmembran, die - im Gegensatz zur äußeren Mitochondrienmembran - eine Permeabilitätsbarriere für eine Reihe wichtiger Metabolite darstellt, voneinander getrennt. Als Folge davon sind die Metabolite nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt.

Die Verbindung des mitochondrialen und cytosolischen Kompartiments, ein Begriff, der zuerst von Cori (1) verwandt wurde, zu einer dynamischen Einheit wird einerseits durch spezifische Transportfunktionen der Mitochondrieninnenmembran, andererseits durch den Austausch gemeinsamer Intermediate hergestellt. Dabei sind neben dem ATP noch ADP, Oxalacetat, sein Redoxpartner Malat, ferner Citrat

und Acetyl-CoA zu den wichtigsten Vertretern zu rechnen, weil sie Ausgangspunkt und Verbindungsglied verschiedenartiger Stoffwechselwege, wie z.B. Fettsäuresynthese, Ketonkörperbildung und Glukoneogenese, sind.

Bezüglich der Regulation dieser Stoffwechselwege wurden verschiedene Vorstellungen entwickelt, die meist aus dem Verhalten isolierter Systeme, Enzyme oder Mitochondrien, abgeleitet wurden, ohne daß ihre physiologische Relevanz genauer überprüfbar war. Für die Regulation der Ketonkörperbildung existieren unter anderem folgende Hypothesen:

Die eine stützt sich auf die Tatsache, daß das Enzym Citratsynthase, das die Bildung von Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA katalysiert, in vitro durch ATP gehemmt wird (2). Demnach sollte der gesteigerten Bildung von Ketonkörpern eine Erhöhung des mitochondrialen ATP Spiegels zu Grunde liegen, die zu einem Rückstau von Acetyl-CoA und damit zu bevorzugter Acetoacetatproduktion führen könnte.

Nach einer anderen Vorstellung (3) kommt es infolge der beim Diabetes gesteigerten Fettsäureverbrennung in der Leber zu einem Anstieg des NADH, damit zu einer reduktiven Verschiebung des Malatdehydrogenasegleichgewichts, das zum Absinken von Oxalacetat als Reaktionspartner für die Citratsynthase-Reaktion und somit zum Acetyl-CoA-Stau führt. Für die Beantwortung der Frage, ob es bei gesteigerter Ketonkörperbildung z.B. im Diabetes tatsächlich

zu einem Anstieg des mitochondrialen ATP bzw. zu einem Abfall des Oxalacetats kommt, gibt es bisher freilich keinen experimentellen Beweis. Ein solcher ist nur möglich durch die Gehaltsbestimmung im Mitochondrienraum, nicht durch Messung des gesamtzellulären ATP oder Oxalacetats, da Veränderungen in einem Raum durch gegensinnige Bewegungen im anderen Raum verdeckt werden könnten.

Auch der Mechanismus der Regulation der Glukoneogenese durch Glucagon ist in der Literatur umstritten. Die zahlreichen vorliegenden Befunde erlauben nicht, zwischen primären und sekundären Wirkungen des Hormons auf den Leberstoffwechsel zu unterscheiden. Bisher gibt es Hinweise dafür, daß Glucagon den mitochondrialen Pyruvatstoffwechsel (4-7) und/oder den Wasserstoffeinstrom in die Mitochondrien (8) stimuliert. Außerdem wurde eine Aktivierung der Pyruvatcarboxylase (9,10), der 2-Oxoglutaratdehydrogenase (11), der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (12) und der Fruktose-1,6-bisphosphatase (9,13,14) diskutiert. Es gibt auch Befunde, die eine Hemmung der Phosphofruktokinase (9,14-17) oder der Pyruvatkinase (14,18-29) vermuten lassen. In einer Reihe von Leberperfusionsstudien (8-12,30-37) wurden Metabolitgehalte in der ganzen Leber gemessen, um den Ort der Glucagonwirkung im Stoffwechselweg der Glukoneogenese zu bestimmen. Aber auch hier wurde die Interpretation der Ergebnisse dadurch erschwert, daß keine zuverlässigen Informationen über die Metabolitkompartimentierung in der Leberzelle

vorlagen, worauf verschiedentlich hingewiesen wurde (9, 11, 12, 38, 39).

Die Trennung intakter Zellen, die es ermöglicht, die in vivo herrschenden Metabolitkonzentrationen im mitochondrialen und extramitochondrialen Raum zu bestimmen, ist methodisch sehr schwierig. Deshalb wurde bisher versucht, mit Hilfe der sogenannten Metabolitindikatorenmethode, die auf einen Vorschlag von Holzer und Lynen (40) zurückgeht (Übersicht 41), die Konzentration von Stoffwechselzwischenprodukten in Mitochondrien und Cytosol zu berechnen. Dabei wird unter der Annahme, daß sich die Reaktanten verschiedener Enzyme im Gleichgewicht befinden, aus den gemessenen Gesamtmetabolitgehalten die subzelluläre Verteilung von Metaboliten errechnet. Obwohl dieses Verfahren eine Reihe anregender und überraschender Ergebnisse erbracht hat, konnten diese nur als vorläufig betrachtet werden, da die Gültigkeit der zugrundeliegenden Prämissen mangels der direkten Bestimmung von Metabolitkonzentrationen in den Kompartimenten experimentell nicht nachgeprüft werden konnte. Heute stehen zur Bestimmung von Metaboliten im cytosolischen und mitochondrialen Kompartiment drei Methoden zur Verfügung. Elbers et al. (42) beschrieben 1974 eine Methode, bei der, ausgehend von isoliert perfundierter Leber, gefrieretrocknetes Lebergewebe durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation in organischen Lösungsmitteln fraktioniert wird. Ebenfalls 1974 führten Zuurendonk und Tager (43) die "Digitonin

Methode" ein. Bei dieser Methode wird die Tatsache ausgenutzt, daß die Mitochondrieninnenmembran einen niedrigeren Cholesteringehalt als die Plasmamembran hat (44). Werden isolierte Leberzellen kurzzeitig mit Digitonin inkubiert, so fällt dieses das Cholesterin der Plasmamembran aus, wodurch diese für die Bestandteile des Cytosols durchlässig wird, während die Mitochondrieninnenmembranen intakt bleiben. Zentrifugiert man digitoninbehandelte Leberzellen, so entweichen die Metabolite und Enzyme des Cytosols in den Überstand, während die noch intakten Mitochondrien in den Niederschlag gehen. Die Kompartimente sind so getrennt und können auf ihren Metabolitgehalt untersucht werden.

Kürzlich wurde von Tischler et al. (45) eine dritte Methode zur Trennung von Cytosol und Mitochondrien beschrieben. Bei dieser Methode werden isolierte Leberzellen unter Druck durch eine dünne Injektionsnadel gepreßt. Durch die dabei auftretenden Scherkräfte wird die Plasmamembran zerstört. Durch Zentrifugation können dann die noch intakten Mitochondrien vom Cytosol abgetrennt und anschließend analysiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der Digitonin Methode die subzelluläre Verteilung von Metaboliten zu bestimmen, denen eine Bedeutung bei der Regulation von Ketogenese und Glukoneogenese zugesprochen wird. Besonderes Interesse galt dabei der hormonellen Regulation dieser Stoffwechselwege.

ERGEBNISSE

1. Gesamtzelluläre Metabolitgehalte und Stoffwechselleistungen isolierter Leberzellen

Die Eignung der verwendeten Leberzellen gefütterter Ratten als Modell für die Leber in situ wird in Tabelle 1 dokumentiert. Die gesamtzellulären Metabolitgehalte nach 10 min Inkubation mit Laktat stimmten gut mit den Gehalten gefrierigestoppter Leber überein. (Ausnahme: erhöhtes Aspartat). Weiterhin waren die Gesamtgehalte von Malat, Citrat, 2-Oxoglutarat und Glutamat nach Inkubation mit Laktat (Tabelle 1) mit jenen vergleichbar, die in Leberzellen kohlehydratreich ernährter Ratten bestimmt wurden (46,47).

Tabelle 2 zeigt einen Vergleich der Metabolitgehalte isolierter Leberzellen 48 Stunden gehungerter Ratten mit den Gehalten isoliert perfundierter Lebern gehungerter Tiere. Auch hier zeigt sich eine gute Übereinstimmung.

Wie Tabelle 3 zeigt, sind die Stoffwechselleistungen dieser Zellen ebenfalls gut vergleichbar mit denen der perfundierten Leber. Demnach stellen unsere Leberzellen ein geeignetes Modell für Studien zur Metabolitkompartimentierung dar.

Tabelle 1

VERGLEICH DER METABOLITGEHALTE ISOLIERTER LEBERZELLEN
GEFÜTTERTER RATTEN MIT DEN GEHALTEN GEFRIERGESTOPPTER
LEBER

Die Leberzellen wurden 10 min mit 10 mM Laktat inkubiert. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM und in Klammern die Anzahl der Zellpräparationen angegeben. Die in der Literatur auf Frischgewicht bezogenen Daten wurden mit 4,94 (36) multipliziert.

Metabolit	Isolierte Leberzellen		Gefriergestopp- tes Lebergewebe	
	{nMol/g TG}		{nMol/g TG}	
			Bereich	Literatur
Coenzym A	290 $\pm$ 40	(8)	221 - 667	48-50
Acetyl-CoA	167 $\pm$ 6	(6)	109 - 200	48-50
Malat	1300 $\pm$ 260	(9)	1452 - 2460	48,49,51
Citrat	1480 $\pm$ 200	(9)	825 - 1482	48,49,51,52
Oxalacetat	22,9 $\pm$ 2,0	(5)	21,7 - 38,5	53-55
2-Oxoglutarat	830 $\pm$ 100	(5)	528 - 1112	48,49,51
Glutamat	8660 $\pm$ 590	(5)	11189 - 11905	48,49
Aspartat	14350 $\pm$ 2270	(5)	3251 - 3458	48,49

Tabelle 2

VERGLEICH DER METABOLITGEHALTE ISOLIERTER LEBERZELLEN
48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN MIT DEN GEHALTEN ISOLIERT
PERFUNDIERTER LEBERN

Die Zellen wurden 40 min in einer serumhaltigen Mischung mit anfänglich 11,9 mM Laktat inkubiert. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM und in Klammern die Anzahl der Zellpräparationen angegeben. Für experimentelle Details siehe Methoden.

Metabolit	Metabolitgehalt {nMol/g TG}			
	Isolierte Leberzellen		Perfundierte Leber	
			Williamson et al. (9)	Parilla et al. (36)
ATP	8830 $\pm$ 400	(9)	12380	7740
ADP	2340 $\pm$ 120	(9)	2550	2333
AMP	670 $\pm$ 40	(7)	470	1595
Acetyl-CoA	179 $\pm$ 21	(9)	189	347
CoASH	600 $\pm$ 60	(6)	771	412
Aspartat	1470 $\pm$ 110	(10)	3210	1902
Glutamat	13500 $\pm$ 1820	(9)	13090	9481
Citrat	1830 $\pm$ 190	(9)	3700	2118
2-Oxoglutarat	2210 $\pm$ 210	(7)	2840	1763
Malat	1020 $\pm$ 170	(10)	1060	1186
Oxalacetat	21,9 $\pm$ 1,8	(13)	18,5	18,7
Pyruvat	1060 $\pm$ 60	(6)	1960	995
Phosphoenol- pyruvat	770 $\pm$ 80	(9)	980	466
3-Phospho- glycerat	540 $\pm$ 60	(6)	1144	351
Glukose-6- phosphat	190 $\pm$ 10	(5)	239	180

Tabelle 3

STOFFWECHSELLEISTUNGEN ISOLIERTER LEBERZELLEN 48 STUNDEN
GEHUNGERTER RATTEN IM VERGLEICH ZUR PERFUNDIERTEN LEBER

Isolierte Leberzellen wurden 40 min in Gegenwart von anfänglich 11,9 mM Laktat inkubiert. Die Leistungen der 10 min Periode zwischen der 30. und der 40. Minute sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. n=Anzahl der Zellpräparationen.

	n	Metabolitveränderung { μ Mol/g TG in 10 min }		
		Isolierte Leberzellen	Perfundierte Leber	
			Williamson, et al. (9) ⁺	Parilla et al. (36) ⁺
Glukose- bildung	18	40,8 $\pm$ 4,0	30,3	27,4
Laktat- verbrauch	8	71 $\pm$ 4	86,1	63,8
Harnstoff- bildung	6	10,1 $\pm$ 1,0	-	2,0
3-Hydroxy- butyrat	12	1,3 $\pm$ 0,3	-	-
Aceto- acetat	13	4,3 $\pm$ 0,5	-	-
Gesamtketon- körperbildung (3-HOB + AcAc)		5,6	4,7	1,6

⁺Die Literaturangaben, bezogen auf 100 g Körpergewicht, wurden umgerechnet auf der Grundlage von 3,7 g Leber pro 100 g Körpergewicht (56) und 4,94 g Frischgewicht = 1 g Trockengewicht (36).

2. Validität der Digitonin Methode (58-60)

In Abbildung 1 ist die Digitonin Methode schematisch dargestellt.

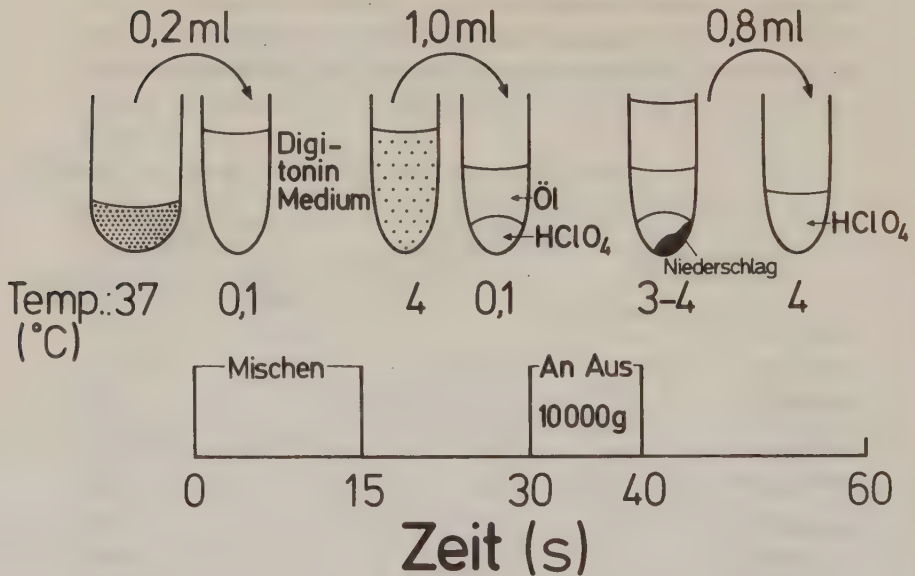


Abb. 1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LEBERZELLFRAKTIONIERUNG NACH DER DIGITONIN METHODE

Während der Inkubation mit Digitonin wird die Plasmamembran für Enzyme und Metabolite durchlässig, während die Innenmembran der Mitochondrien intakt bleibt. Dies wird durch die Tatsache belegt, daß unter den Standardbedingungen (4 mg/ml Digitonin, 30 sec Inkubation) sich 80,7% LDH, 29% AK und 2,9% GluDH im Überstand befanden (57).

Tabelle 4

VERSCHLEPPUNG VERSCHIEDENER SUBSTANZEN AUS DEM DIGITONINMEDIUM IN DIE NIEDERSCHLAGS-
FRAKTION WÄHREND DER FRAKTIONIERUNG VON LEBERZELLEN MIT DER STANDARD-DIGITONINMETHODE

Dem Digitoninmedium zugesetzte Substanz						
	Glukose-6- Phosphat	¹⁴ C-Sucrose	³ H-Inulin	¹⁴ C-Citrat	¹⁴ C-Oxal- acetat	³ H-Acetyl- CoA
Zugegebene (nMol) Menge (I.p.m.)	5000 -	260 82000	- 36000	11,9 75000	1,4 13000	1,6 54000
In der Niederschlags- fraktion gefundene Menge (in % der zugegebe- nen Menge)	0,23	0,3	0,61	0,8	0,6	1,1
Verschleppung aus dem Cytosol (% der Menge im Nie- derschlag, kalkuliert aus den Daten der Tabelle 13)	0	-	-	0,6	2,2	0,9

11

Demnach scheint mit der Digitonin Methode eine fast vollständige Trennung von Cytosol und Mitochondrienmatrix zu gelingen.

Für den Nachweis der Brauchbarkeit der Digitonin Methode ist das Problem der Metabolitverschleppung aus dem cytosolischen in den mitochondrialen Raum von großer Bedeutung. Zur Klärung dieser Frage wurden dem Digitoninmedium Spuren radioaktiv markierter Metabolite zugesetzt, ehe die Fraktionierung unter Standardbedingungen durchgeführt wurde. Wie Tabelle 4 zeigt, betrug die Verschleppung von Citrat, Acetyl-CoA, Oxalacetat, Inulin und Sucrose aus dem Digitoninmedium in die Mitochondrienfraktion zwischen 0,2 und 1,1% (58,59). Auf den Metabolitgehalt der Pelletfraktion bezogen (letzte Zeile in Tabelle 4) ist diese Verschleppung zu vernachlässigen.

Zum Ausschluß einer etwaigen Umverteilung der Metabolite während der Fraktionierung wurden Untersuchungen in Gegenwart von Inhibitoren des mitochondrialen Metabolittransports durchgeführt. Wie aus den Ergebnissen der Tabelle 5 hervorgeht, blieben die mitochondrialen Metabolitgehalte durch die Anwesenheit der aufgeführten Hemmstoffe praktisch unbeeinflusst. Nur im Falle des Malates zeichnet sich eine retinierende Wirkung durch den Inhibitor ab. Nach Fraktionierung in Gegenwart von α -Cyano-4-hydroxycinnamat fanden wir entgegen den Erwartungen den Pyruvatgehalt der Mitochondrienfraktion erniedrigt. Dieser Effekt scheint jedoch durch eine Verunreinigung des Präparates hervor-

Tabelle 5

EINFLUSS MITOCHONDRIALER TRANSPORTINHIBITOREN AUF DEN METABOLITGEGHALT DER MITOCHONDRI-
ALEN FRAKTION ISOLIERTER LEBERZELLEN GEFÜTTERTER RATTEN

Die Leberzellen wurden 10 min in Gegenwart von 10 mM Laktat inkubiert. Die Transport-
inhibitoren waren nur im Fraktionierungsmedium anwesend. Die Anzahl verschiedener Zell-
präparationen ist in Klammern angegeben.

Metabolit	Inhibitor (Konz.)	Mitochondrialer Gehalt {nMol/g TG} ohne Inhibitor mit Inhibitor
ATP	Carboxyatraktylosid (1mM)	1620 ± 90 (3) 1620 ± 170 (3)
ADP	Carboxyatraktylosid (1mM)	690 ± 90 (3) 710 ± 100 (3)
Citrat	1,2,3-Tricarboxybenzol (5mM)	520 ± 70 (5) 540 ± 60 (5)
Glutamat	N-Ethylmaleimid (1mM)	1470 ± 170 (5) 1610 ± 160 (5)
2-Oxoglutarat	Phenylsuccinat (5mM)	140 ± 20 (5) 150 ± 40 (5)
Pyruvat	α-Cyano-4-hydroxycinnamat (1mM)	250 ± 30 (4) 240 ± 40 (4)
Malat	n-Butylmalonat (5mM)	470 ± 80 (4) 690 ± 110 (4)
Pyruvat	α-Cyano-4-hydroxycinnamat (1mM) (nicht umkristallisiert)	480 ± 50 (5) 390 ± 30 (5)

gerufen worden zu sein, da er nach zweimaligem Umkristallisieren nicht mehr auftrat.

Vor allem bei den mitochondrialen Adeninnukleotiden drohte die Möglichkeit einer Verfälschung durch noch weiterlaufende Phosphorylierung oder Dephosphorylierung während der 30 sec der Zellfraktionierung. Um dies zu prüfen, wurde ein Teil der Zellen unverzüglich mit Perchlorsäure enteiweißt, während ein anderer Teil der Digitoninfraktionierung unterworfen wurde. Im Falle einer artefiziellen Aufphosphorylierung des mitochondrialen ADP bzw. Dephosphorylierung von ATP sollte der ATP/ADP-Quotient, gebildet aus der Summe der cytosolischen und mitochondrialen Adeninnukleotidgehalte, größer bzw. kleiner sein als der ATP/ADP-Quotient der nicht der Fraktionierungsprozedur unterworfenen Zellen. Wie aus der Tabelle 6 hervorgeht, ergaben sich bei Inkubation ohne Substratzusatz keine derartigen Unterschiede. Nicht ganz so eindeutig fiel das Ergebnis aus, wenn von Zellen mit erhöhtem (Inkubation mit Adenosin) oder erniedrigtem (Inkubation mit Fruktose) Adeninnukleotidgehalt ausgegangen wurde. Die leichte Erniedrigung des Summenquotienten von ATP/ADP (N + Ü) gegenüber dem ATP/ADP-Quotienten der unfraktionierten Zellen im ersteren Falle könnte als Folge einer geringfügigen Spaltung mitochondrialen ATPs während der Fraktionierung gedeutet werden. Umgekehrt würde das Verhalten von ATP/ADP im Falle der Fruktose auf eine Aufphosphorylierung von ADP hindeuten.

Tabelle 6

WIEDERFINDUNG ZELLULÄRER ADENINNUKLEOTIDE IN DEN CYTOSOLISCHEN UND MITOCHONDRIALEN FRAKTIONEN ISOLIERTER LEBERZELLEN NACH DIGITONINBEHANDLUNG

Isolierte Leberzellen aus 48 h gehungerten Ratten wurden 10 min in Anwesenheit der angegebenen Substrate inkubiert. Mittelwerte $\pm$ SEM von 4 verschiedenen Zellpräparationen sind angegeben.

Zugegebenes Substrat	Metabolit	Unfraktionierte Zellen	Gehalt $\left\{ \frac{\mu\text{mol}}{\text{g TG}} \right\}$		
			Niederschlag (N)	Überstand (Ü)	N + Ü
-	ATP	$8,98 \pm 1,04$	$2,61 \pm 0,27$	$6,73 \pm 0,62$	$9,34 \pm 0,79$
	ADP	$3,41 \pm 0,28$	$1,92 \pm 0,14$	$1,73 \pm 0,10$	$3,65 \pm 0,21$
	ATP/ADP	$2,64 \pm 0,20$	-	-	$2,56 \pm 0,16$
Adenosin (5mM)	ATP	$11,55 \pm 1,25$	$2,61 \pm 0,39$	$8,94 \pm 0,91$	$11,55 \pm 1,05$
	ADP	$4,65 \pm 0,34$	$2,61 \pm 0,33$	$2,47 \pm 0,41$	$5,06 \pm 0,71$
	ATP/ADP	$2,48 \pm 0,14$	-	-	$2,25 \pm 0,19$
Fruktose (10mM)	ATP	$4,30 \pm 0,27$	$1,57 \pm 0,23$	$3,86 \pm 0,41$	$5,42 \pm 0,38$
	ADP	$3,02 \pm 0,34$	$1,65 \pm 0,12$	$1,42 \pm 0,18$	$3,06 \pm 0,14$
	ATP/ADP	$1,48 \pm 0,21$	-	-	$1,79 \pm 0,12$

⁺Die Extrakte der unfraktionierten Zellen wurden durch Mischen von 0,4 ml Inkubationsmischung mit 80 μl 70% HClO_4 hergestellt und nach Neutralisation analysiert.

Zur weiteren Klärung dieser Frage wurde die Digitonin Methode bei einer Temperatur von -5°C - also 10° niedriger als normalerweise - durchgeführt. Wie man aus den Daten der Tabelle 7 ersehen kann, war der mitochondriale ATP-Gehalt bei der niedrigeren Temperatur eher etwas erhöht. Dies würde darauf hindeuten, daß während der Fraktionierung bei $+4^{\circ}\text{C}$ ein geringer Teil des ATP dephosphoryliert würde.

3. Substrateffekte auf die subzelluläre Metabolitverteilung in isolierten Leberzellen gefütterter Ratten (60)

3.1. Mitochondriale Veränderungen

Tabelle 8 zeigt die Metabolitgehalte im Mitochondrienraum nach Inkubation mit verschiedenen Substraten. Die Veränderungen des Coenzym A-Gehalts (statistisch signifikant nur bei Anwesenheit von Oleat) waren den Veränderungen des Acetyl-CoA-Gehalts entgegengesetzt, sodaß die Summe beider unter allen Bedingungen nahezu konstant blieb. Der Acetyl-CoA-Gehalt war relativ großen Schwankungen unterworfen. Laktat erniedrigte den endogenen und den durch Oleat erhöhten Gehalt um 20%. Im Gegensatz zu Laktat erhöhte Pyruvat den Acetyl-CoA-Gehalt um 33%. Durch Pyruvat wurden auch die Spiegel von Oxalacetat, Malat und Citrat um 76%, 100% bzw. 250% erhöht.

Verglichen mit Pyruvat bzw. Laktat als Substrat erniedrigte Alanin die Gehalte von Malat, Oxalacetat, Citrat und

Tabelle 7

EINFLUSS DER TEMPERATUR WÄHREND DER DIGITONINFRAKTIONIERUNG AUF DIE MITOCHONDRIALEN GEHALTE VON ADENINNUKLEOTIDEN IN ISOLIERTEN HEPATOZYTEN GEHUNGERTER RATTEN

Isolierte Hepatozyten 48 h gehungerter Ratten wurden 10 min mit den angegebenen Substraten inkubiert. Dann wurde mit einem Teil des Inkubationsansatzes die Fraktionierung wie im Methodenteil beschrieben bei +4°C durchgeführt. Mit einem anderen Teil wurde die Fraktionierung bei -5°C bis -6°C durchgeführt. Dazu wurde ein Fraktionierungsmedium mit 15 mg/ml Digitonin in einer Lösung von 3 mM EDTA mit 25% DMSO verwandt. Die höhere Digitoninkonzentration wurde benötigt, um einen ausreichenden Austrom von α -Glycero-phosphat, ein cytosolisches Markermolekül, zu erreichen. Dieser Ausstrom betrug bei +4°C $88 \pm 1,2\%$ (n=6) und bei -5°C $82,5 \pm 1,8\%$ (n=6). ^aP < 0,05 ^bP < 0,005

Zugegebenes Substrat	(mM)	Metabolit	Mitochondrialer Gehalt (μ Mol/g TG)	
			+4°C	-5°C
-	-	ATP	2,37 $\pm$ 0,17 (5)	2,95 $\pm$ 0,40 (5)
		ADP	1,62 $\pm$ 0,27 (5)	1,70 $\pm$ 0,25 (5)
		ATP/ADP	1,52 $\pm$ 0,25 (5)	1,84 $\pm$ 0,42 (5)
Adenosin	5	ATP	2,17 $\pm$ 0,19 (5)	2,86 $\pm$ 0,21 ^b (5)
		ADP	2,23 $\pm$ 0,33 (5)	2,19 $\pm$ 0,26 (5)
		ATP/ADP	0,99 $\pm$ 0,16 (5)	1,33 $\pm$ 0,23 ^a (5)
Fruktose	10	ATP	1,15 $\pm$ 0,14 (6)	1,38 $\pm$ 0,18 (6)
		ADP	1,53 $\pm$ 0,11 (6)	1,89 $\pm$ 0,18 (6)
		ATP/ADP	0,69 $\pm$ 0,05 (6)	0,79 $\pm$ 0,09 (6)

2-Oxoglutarat, während die Spiegel von Aspartat und Glutamat - vermutlich infolge Transaminierung über Alaninaminotransferase und Aspartataminotransferase - erhöht waren (Tabelle 8).

Inkubation der Leberzellen mit Oleat hatte eine Erhöhung des mitochondrialen Acetyl-CoA, Malats und Citrats zur Folge. Eine Substratkombination aus Laktat und Oleat führte bei Citrat und Oxalacetat zu vergleichbaren Veränderungen wie durch Pyruvat, während der Effekt auf den mitochondrialen Malatgehalt noch stärker ausgeprägt war.

3.2. Metabolitveränderungen im Cytosol

Der cytosolische Raum von Leberzellen gefütterter Ratten enthielt unter verschiedenen Substratbedingungen etwa 50% des zellulären Citrats und 90% des Malats und Oxalacetats. Bei Anwesenheit von Laktat, Alanin, Pyruvat oder Ethanol im Inkubationsmedium waren mehr als 90% des Aspartats und etwa 80% des 2-Oxoglutarats und des Glutamats im Cytosol zu finden. Außerdem enthielt die Cytosolfraction 50% des zellulären Acetyl-CoA ohne exogenes Substrat bzw. mit Laktat, Pyruvat, Alanin oder Aspartat, aber nur 26%, wenn Oleat dem Inkubationsmedium zugesetzt wurde.

Wie in der mitochondrialen Fraktion waren die Malat- und Citratgehalte im Cytosol nach Inkubation mit Pyruvat oder Laktat erhöht (Tabelle 9). Alanin führte im Cytosol zu vergleichbaren Veränderungen wie in den Mitochondrien: die Citrat- und 2-Oxoglutaratspiegel waren erniedrigt, während

Tabelle 8

METABOLITGEHALTE IN DER MITOCHONDRIALEN FRAKTION ISOLIERTER LEBERZELLEN GEFÜTTERTER RATTEN
NACH INKUBATION MIT VERSCHIEDENEN SUBSTRATEN

Die Leberzellen wurden 10 min mit den angegebenen Substratkonzentrationen inkubiert und dann mit der Digitonin Methode fraktioniert. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM und in Klammern die Anzahl der verschiedenen Zellpräparationen. Statistische Signifikanz wurde mit Students t-Test für unverbundene Stichproben berechnet.

$a_p < 0,05$ $b_p < 0,025$ $c_p < 0,0025$ $d_p < 0,0005$

Substrat	Konz. (mM)	CoASH	AcCoA	Citrat	Gehalt (nmol/g TG)	Malat	Oxalacetat	Aspartat	Glutamat	2-Oxoglu- tarat
-	-	23o+3o ^a (8)	87+ 4 (8)	5oo+1oo (9)	4o+1o (9)	1,68+o,64 (3)	-	-	-	-
Laktat	1o	25o+4o (8)	72+ 5 ^b (8)	66o+ 8o ^a (9)	14o+5o ^a (9)	1,85+o,55 (5)	68o+ 7o (5)	147o+17o (5)	14o+2o (5)	
Pyruvat	7	2oo+3o (9)	116+ 8 ^c (8)	1oo+16o ^b (9)	14o+3o ^c (9)	2,95+o,51 (6)	45o+ 9o (3)	197o+15o (3)	15o+2o (3)	
Alanin	7	24o+3o (7)	86 (2)	29o+ 3o ^a (7)	1o+ 6 ^a (7)	o,82+o,54 (3)	86o+14o (5)	3o5o+37o (5)	14+ 4 (5)	
Oleat	o,9	17o+3o ^b (7)	155+1o ^c (8)	72o+ 7o ^c (9)	12o+2o ^d (9)	2,15+o,38 (6)	-	-	-	
Oleat + Laktat	o,9 1o	16o+3o ^a (7)	123+6 ^c (9)	117o+15o ^c (7)	51o+9o ^d (8)	2,79+o,36 (5)	-	-	-	
Ethanol	12	22o+4o (8)	128+1o ^c (9)	42o+ 6o (8)	17o+4o ^b (8)	o,89+o,45 (4)	32o (2)	193o (2)	7o (2)	
Aspartat	7	2oo (2)	87+ 6 (9)	-	-	7,12+o,58 ^b (3)	-	-	-	

Tabelle 9

METABOLITGEHALTE IN DER CYTOSOLISCHEN FRAKTION ISOLIERTER LEBERZELLEN GEFÜTTERTER RATTEN UNTER VERSCHIEDENEN SUBSTRATBEDINGUNGEN

Isolierte Leberzellen wurden 10 min in Gegenwart der angegebenen Substratkonzentrationen inkubiert und dann mit der Digitonin Methode fraktioniert. Es sind Mittelwerte + SEM und in Klammern die Anzahl der verschiedenen Zellpräparationen angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit Students t-Test für unverbundene Stichproben berechnet.

$a_p < 0,05$ $b_p < 0,025$ $c_p < 0,005$ $d_p < 0,0025$ $e_p < 0,0005$

Substrat	Konz. (mM)	CoASH	AcCoA	Citrat	Gehalt (nMol/g TG)		Aspartat	Glutamat	2-Oxo- glutarat
					Malat	Oxalacetat			
-	-	90+30 (8)	82+8 (8)	430+130 (8)	390+60 (9)	14,8+2,7 (3)	-	-	-
Laktat	10	50+20 (8)	91+11 (5)	820+130 ^b (9)	1160+220 ^d (9)	19,2+2,5 (4)	13670+2220 (5)	7390+580 (5)	700+80 (5)
Pyruvat	7	-	107+12 ^b (8)	1180+190 ^c (8)	860+260 (8)	44,9+6,3 ^c (6)	7380+1820 (3)	8140+1450 (3)	700+90 (3)
Alanin	7	-	102 (2)	170+70 ^a (7)	330+40 (7)	19,1+1,8 (3)	16270+2210 (5)	11340+1140 (3)	64+14 (5)
Oleat	0,9	30+10 ^a (7)	51+11 ^e (7)	830+200 ^a (9)	1500+240 ^e (9)	38,7+6,6 ^b (5)	-	-	-
Oleat + Laktat	0,9 10	40+20 (7)	46+6 ^e (9)	1750+330 ^d (7)	2870+560 ^d (8)	48,2+5,2 ^e (5)	-	-	-
Ethanol	12	-	78+11 (8)	310+70 (8)	1080+210 ^b (8)	4,0+0,6 ^a (3)	5480 (2)	5210 (2)	460 (2)
Aspartat	7	-	70+5,5 (8)	-	-	23,9+9,6 ^a (3)	-	-	-

die von Glutamat und Aspartat anstiegen. Oleat und Oleat plus Laktat führten zu einem starken Anstieg des cytosolischen Malats und Citrats, während das cytosolische Acetyl-CoA abfiel.

Die Ketonkörperbildungsrate unter den verschiedenen Substratbedingungen zeigt Tabelle 10. Die höchsten Bildungsraten wurden bei Inkubation mit Oleat, bzw. Oleat plus Laktat gemessen. Unter diesen Bedingungen war der 3-HOB/AcAc-Quotient auf etwa 1 erhöht. Eine ähnliche Erhöhung wurde nach Inkubation mit Ethanol beobachtet, während Alanin zu einer Erniedrigung des 3-HOB/AcAc-Quotienten führte.

4. Einfluß von Glucagon auf Stoffwechselleistungen und Metabolitverteilung in isolierten Leberzellen gehungerter Ratten (59)

4.1. Veränderungen der Stoffwechselleistungen isolierter Leberzellen durch Glucagon

Glucagon stimulierte die Glukosebildung isolierter Leberzellen 48 h gehungerter Ratten mit Laktat als Substrat um 79%, während Harnstoffbildung und Ketogenese um 132 bzw. 84% gesteigert wurden (Tabelle 11). Gleichzeitig erhöhte Glucagon den Laktatverbrauch, das 3-HOB/AcAc-Verhältnis und das Laktat/Pyruvat-Verhältnis. Diese Veränderungen stimmen mit den Effekten von Glucagon an der isoliert perfundierten Leber überein (9-11,34,61-63).

Tabelle 10

KETONKÖRPERBILDUNGSRATE VON ISOLIERTEN LEBERZELLEN GE-
FÜTTETER RATTEN NACH INKUBATION MIT VERSCHIEDENEN SUB-
STRATEN

Leberzellen wurden 10 min mit den angegebenen Substrat-
konzentrationen inkubiert. Die Inkubationsmischung wurde,
wie im Methodenteil angegeben, auf Ketonkörper analysiert.
Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM und in Klammern die An-
zahl der Zellpräparationen.

Substrat	Konz. (mM)	Ketonkörperbildung { μ Mol/g TG in 10 min }			$\frac{3\text{-HOB}}{\text{AcAc}}$
		AcAc	3-HOB	3-HOB+AcAc	
-	-	13,1 $\pm$ 1,7 (10)	5,5 $\pm$ 1,4 (10)	18,6	0,42
Laktat	10	10,9 $\pm$ 1,7 (10)	5,0 $\pm$ 0,9 (10)	15,9	0,46
Pyruvat	7	18,3 $\pm$ 2,6 (10)	9,2 $\pm$ 1,1 (10)	27,5	0,50
Alanin	7	13,0 $\pm$ 1,9 (5)	2,5 $\pm$ 0,8 (5)	15,5	0,19
Oleat	0,9	31,4 $\pm$ 2,8 (10)	23,7 $\pm$ 1,5 (10)	55,1	0,75
Oleat + Laktat	0,9 10	21,3 $\pm$ 1,7 (9)	24,4 $\pm$ 1,1 (9)	45,7	1,15
Ethanol	12	8,5 $\pm$ 1,2 (10)	7,5 $\pm$ 1,4 (10)	16,0	0,88
Aspartat	7	16,6 $\pm$ 2,5 (9)	5,6 $\pm$ 2,1 (9)	22,2	0,34

Tabelle 11

STIMULIERUNG VON GLUKONEOGENESE, KETOGENESE UND HARNSTOFF-
BILDUNG ISOLIERTER LEBERZELLEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RAT-
TEN DURCH GLUCAGON

Leberzellen wurden 30 min in einer serumhaltigen Inkubationsmischung wie bei Methoden beschrieben inkubiert. Dann wurde Glucagon (7 μ g/ml) zugegeben und die Inkubation 10 min fortgesetzt. Die Laktatkonzentration betrug 11,9 mM zu Beginn der Inkubation und 8,5 mM zu Beginn der Glucagoninkubation. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM und die Anzahl (n) der verschiedenen Zellpräparationen angegeben. Bildungs- und Verbrauchsraten beziehen sich auf die 10 min Periode zwischen der 30. und 40. Minute.

	n	Metabolitveränderung { μ Mol/g TG in 10 min }		
		Kontrolle	Glucagon	P
Glukose	18	40,8 $\pm$ 4,0	72,9 $\pm$ 4,6	<0,001
Laktat- verbrauch	8	71 $\pm$ 4	99 $\pm$ 12	<0,05
Harnstoff	6	10,1 $\pm$ 1,0	23,4 $\pm$ 4,4	<0,01
3-Hydroxy- butyrat	12	1,3 $\pm$ 0,3	6,9 $\pm$ 0,7	<0,0005
Acetoacetat	13	4,3 $\pm$ 0,5	3,4 $\pm$ 1,1	
3-HOB/AcAc		0,3	2,0	
[Laktat] [Pyruvat]		13	21	

4.2. Einfluß von Glucagon auf Metabolite im Cytosol

Wie Tabelle 12 zeigt, waren nach Glucagongabe die cytosolischen Gehalte von ATP, Malat, Aspartat, Phosphoenolpyruvat, Pyruvat, Glukose-6-Phosphat, 2-Oxoglutarat, Glutamat und 3-Phosphoglycerat statistisch signifikant verändert. Die übrigen Metabolite blieben unverändert. Die größten Veränderungen zeigten die 2-Oxoglutarat- und Glutamatspiegel, die auf etwa 30% der Kontrolle abfielen. Kontrollversuche zeigten, daß die Glutaminkonzentration nicht erhöht, sondern eher vermindert war. (Daten nicht gezeigt). Die Konzentration von ATP war durch Glucagon leicht erniedrigt, wodurch der cytosolische ATP/ADP-Quotient von 5,6 auf 4,5 fiel.

Entsprechend einem Abfall der Pyruvatkonzentration um 37% und gleichbleibender cytosolischer Laktatkonzentration von 8,2 mM erhöhte sich der cytosolische Laktat/Pyruvat-Quotient von 13 auf 21. Ein Anstieg des Reduktionsgrades der cytosolischen Pyridinnukleotide zeigte sich auch im Malat/Oxalacetat-Quotienten, der durch die Erhöhung des Malatspiegels bei unverändertem Oxalacetat von 47 auf 63 anstieg.

Von den glykolytischen Zwischenprodukten stiegen unter Glucagon Phosphoenolpyruvat und 3-Phosphoglycerat um mehr als 70%, Glukose-6-Phosphat um 25% gegenüber den Kontrollen an. Der Glukosegehalt der Hepatozyten war durch Glucagon unverändert. Der Kontrollwert betrug $14,2 \pm 0,58$, nach Glucagon $15,33 \pm 0,58$ $\mu\text{Mol/g TG}$ (Mittelwert $\pm$ SEM von sieben Zellpräparationen).

Tabelle 12

METABOLITVERÄNDERUNG IM CYTOSOL ISOLIERTER LEBERZELLEN 48
STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN NACH INKUBATION MIT GLUCAGON

Versuchsbedingungen wie in Legende zu Tabelle 11 angegeben.

^aP < 0,05 ^bP < 0,01 ^cP < 0,005 ^dP < 0,0005

Metabolit	Gehalt (nMol/g TG)		Glucagon- effekt (%)	Konzentration (mM)	
	Kontrolle	Glucagon		Kontrolle	Glucagon
ATP	6020+390 (9)	5180+390 ^c (9)	-14	4,36	3,71
ADP	1080+ 70 (9)	1160+130 (9)		0,78	0,84
AMP	270+110 (4)	340+130 (4)		0,20	0,25
Acetyl-CoA	78+ 13 (9)	75+ 7 (9)		0,057	0,054
CoA SH	100+ 30 (6)	140+ 40 (6)		0,073	0,102
Aspartat	1360+120 (10)	1670+180 ^a (10)	+23	0,99	1,22
Glutamat	10570+1770 (8)	2990+530 ^d (8)	-72	7,66	2,19
Citrat	790+130 (8)	630+120 (8)		0,58	0,46
2-Oxoglu- tarat	1680+250 (7)	500+ 50 ^c (7)	-70	1,23	0,36
Malat	800+140 (10)	1310+180 ^d (10)	+64	0,58	0,96
Oxalacetat	17,1+1,9 (11)	20,7+2,1 (11)		0,013	0,014
Pyruvat	880+ 70 (6)	550+ 80 ^d (6)	-37	0,64	0,40
Phosphoenol- pyruvat	430+ 60 (9)	740+ 70 ^c (9)	+72	0,31	0,54
3-Phospho- glycerat	480+ 50 (6)	860+120 ^b (6)	+79	0,35	0,63
Glukose-6- Phosphat	200+ 10 (6)	250+ 10 ^c (6)	+25	0,14	0,18

4.3. Einfluß von Glucagon auf Metabolite im Mitochondrienraum

Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgeführt. Der Abfall von 2-Oxoglutarat und Glutamat war in der Mitochondrienfraktion noch ausgeprägter als im Cytosol. Dagegen bewirkte Glucagon hier einen Anstieg des ATPs, wodurch der mitochondriale ATP/ADP-Quotient, im Gegensatz zum Cytosol, von 2,2 auf 2,5 anstieg. Die ADP-Konzentration blieb auch in den Mitochondrien unverändert. Der mitochondriale Acetyl-CoA-Spiegel wurde durch Glucagon um 25% erhöht, während der Coenzym A-Gehalt unverändert blieb. Die Oxalacetatkonzentration war um 14% erniedrigt, ohne daß Veränderungen der Citrat-, Malat- und Aspartatkonzentrationen zu bemerken waren.

Überraschend war der Befund, daß sowohl mit, als auch ohne Glucagon 40% des zellulären Phosphoenolpyruvats und 20% des 3-Phosphoglycerats in der Mitochondrienfraktion lokalisiert waren.

Es ist bekannt, daß Lebermitochondrien glucagonbehandelter Ratten eine erhöhte Pyruvataufnahme zeigen (4-7). Es stellte sich deshalb die Frage einer mitochondrialen Akkumulation von Pyruvat. Wie aus Tabelle 13 hervorgeht, blieb jedoch die mitochondriale Pyruvatkonzentration durch Glucagon unverändert.

Tabelle 14 zeigt den Einfluß von Glucagon auf die Konzentrationsgradienten zwischen Mitochondrien und Cytosol. Die Gradienten von ATP, Acetyl-CoA, Citrat und Pyruvat wurden

Tabelle 13

METABOLITVERÄNDERUNGEN IM MITOCHONDRIALEN RAUM ISOLIERTER
LEBERZELLEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN NACH INKUBATION
MIT GLUCAGON

Versuchsbedingungen wie in Legende zu Tabelle 11 angegeben.

^aP < 0,05 ^bP < 0,005 ^cP < 0,001

Metabolit	Gehalt (nMol/g TG)		Glucagon-	Konzentration (mM)	
	Kontrolle	Glucagon	effekt (%)	Kontrolle	Glucagon
ATP	2810 ± 280 (9)	3500 ± 340 ^b (9)	+25	16,98	21,15
ADP	1260 ± 60 (9)	1380 ± 90 (9)		7,61	8,34
AMP	480 ± 90 (7)	460 ± 70 (7)		2,90	2,78
Acetyl-CoA	101 ± 11 (9)	127 ± 10 ^c (9)	+26	0,61	0,77
CoASH	510 ± 70 (6)	530 ± 50 (6)		3,08	3,20
Aspartat	110 ± 14 (11)	115 ± 20 (11)		0,66	0,69
Glutamat	2570 ± 370 (8)	510 ± 180 ^c (8)	-80	15,52	3,07
Citrat	1040 ± 130 (10)	1030 ± 120 (10)		6,28	6,22
2-Oxoglutarat	530 ± 80 (7)	130 ± 30 ^b (7)	-75	3,20	0,79
Malat	220 ± 40 (10)	250 ± 60 (10)		1,33	1,51
Oxalacetat	4,65 ± 0,54 (11)	3,98 ± 0,40 ^a (11)	-14	0,028	0,024
Pyruvat	180 ± 20 (6)	180 ± 30 (6)		1,08	1,08
Phosphoenolpyruvat	340 ± 60 (9)	510 ± 70 ^b (9)	+50	2,05	3,08
3-Phosphoglycerat	120 ± 70 (7)	170 ± 90 (7)		0,72	1,03
Glukose-6-Phosphat	0	0			

steiler, während die von Glutamat und Malat durch Glucagon abgeflacht wurden.

Tabelle 14

GLUCAGONWIRKUNG AUF DAS VERHÄLTNIS DER MITOCHONDRIALEN (m) ZUR CYTOSOLISCHEN (c) METABOLITKONZENTRATION UND AUF DIE HÖHE DES CYTOSOLISCHEN ANTEILS DER ZELLULÄREN METABOLITGEHALTE

Die Gradienten wurden aus den Daten der Tabellen 12 und 13 errechnet. Näheres siehe dort.

Metabolit	Konzentrations- gradient (m/c)		Cytosolischer Teil in % des zellulären Metabolitgehalts	
	Kontrolle	Glucagon	Kontrolle	Glucagon
ATP	3,9	5,7	68,2	59,7
ADP	9,8	9,9	46,2	45,7
AMP	14,5	11,1	36,0	38,8
Acetyl-CoA	10,7	14,3	43,6	37,1
CoASH	42,2	31,4	16,4	20,9
Aspartat	0,7	0,6	92,5	93,6
Glutamat	2,0	1,4	80,4	85,4
Citrat	10,8	13,5	38,8	37,9
2-Oxoglutarat	2,6	2,2	76,0	79,4
Malat	2,3	1,6	78,2	84,0
Oxalacetat	2,2	1,7	78,7	83,9
Pyruvat	1,7	2,7	83,0	75,3
Phosphoenol- pyruvat	6,6	5,7	55,8	59,2
3-Phospho- glycerat	2,1	1,6	80,0	83,5

5. Abhängigkeit der Glucagonwirkungen von der Glucagonkonzentration (64)

Abbildung 2 zeigt die Abhängigkeit einiger Stoffwechselwirkungen des Glucagons von der eingesetzten Hormonkonzentration. Nahezu maximale Effekte auf die Spiegel von 2-Oxoglutarat und Glutamat, die Ketonkörperbildung und die Glukoneogenese wurden bei einer Glucagonkonzentration von 20 nM erhalten. Die niedrigste Glucagonkonzentration, die einen signifikanten Effekt ($P < 0,05$ verglichen mit hormonfreier Kontrolle) auslöste, lag bei 2 nM. Die weitgehende Übereinstimmung der Dosis-Wirkungskurven in Abbildung 2 sei bereits hier hervorgehoben. Die gleiche Glucagonabhängigkeit wurde für den Redoxzustand der mitochondrialen Pyridinnukleotide (65), angezeigt durch das 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Verhältnis, gefunden (Abbildung 3).

6. Ketonkörperbildung isolierter Leberzellen nach Glucagoninjektion in vivo (66)

Nach Untersuchungen von McGarry et al. (67) ist die Ketonkörperbildung der isoliert perfundierten Rattenleber gesteigert, wenn die Tiere vorher mit Glucagon behandelt wurden. Es wurde deshalb geprüft, ob dieser Effekt auch in isolierten Hepatozyten glucagonbehandelter Ratten nachzuweisen ist. Wie Abbildung 4 zeigt, ist dies in der Tat der Fall, wenn die Zellen mit Oleat als Substrat inkubiert werden. Ohne zugesetztes Substrat sind die Unterschiede zwischen Kontroll- und Glucagonzellen nicht signifikant.

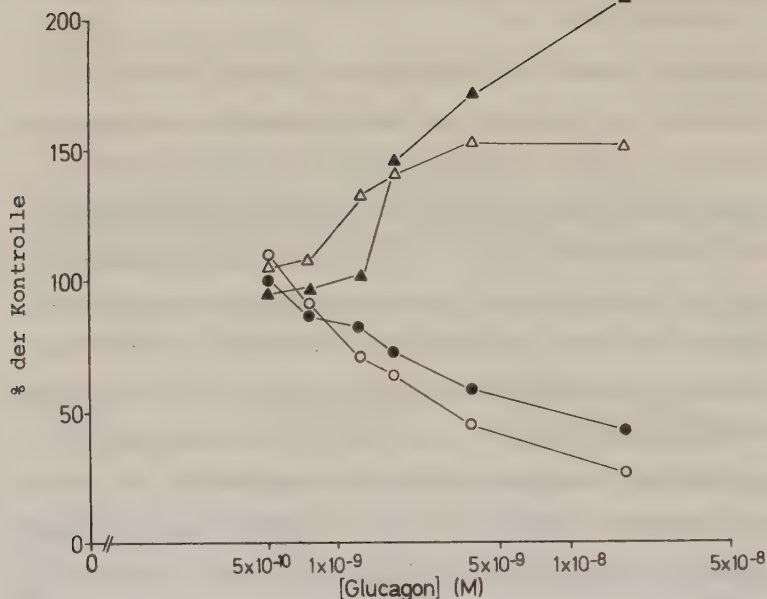


Abb. 2 ABHÄNGIGKEIT DER GESAMTGEHALTE VON 2-OXOGLUTARAT (○) UND GLUTAMAT (●), SOWIE DER GLUKONEOGENESE (Δ) UND KETOGENESE (▲) ISOLIERTER LEBERZELLEN VON DER GLUCAGONKONZENTRATION

Mittelwerte von 6 verschiedenen Zellpräparationen 48 h gehungerter Ratten sind in Prozent der hormonfreien Kontrollen angegeben. Substrat: 12 mM Laktat. Die SEM-Werte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet, sie lagen bei $\pm 10\%$ der Mittelwerte. Die Kontrollwerte für 2-Oxoglutarat und Glutamat waren $1,46 \pm 0,18$ bzw. $13,6 \pm 1,6$ $\mu\text{Mol/g TG}$. Die Kontrollwerte der Glukose-, 3-Hydroxybutyrat- und Acetoacetatproduktion waren $54,8 \pm 4,5$, $1,6 \pm 0,3$ und $4,5 \pm 0,4$ $\mu\text{Mol/g TG}$ in 10 min.

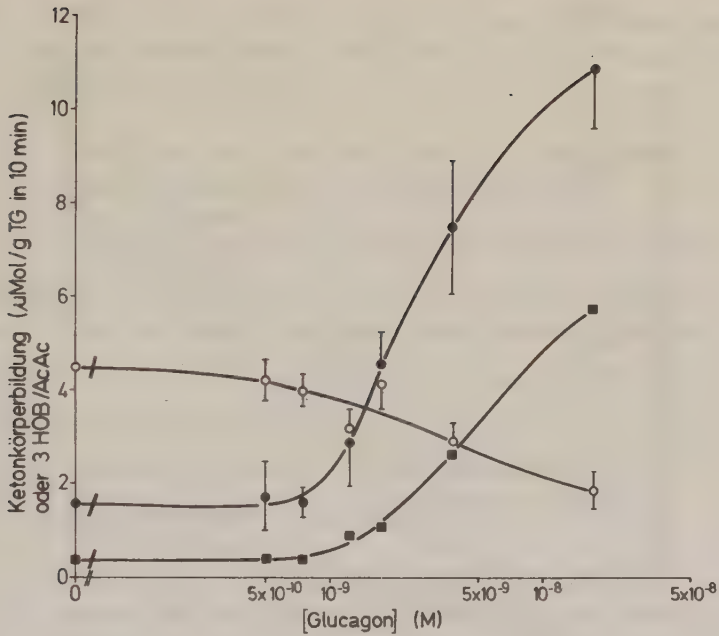


Abb. 3 ABHÄNGIGKEIT DER BILDUNG VON 3-HYDROXYBUTYRAT (●) UND ACETOACETAT (○) UND DES 3-HYDROXYBUTYRAT/ACETOACETAT-VERHÄLTNISSES (■) ISOLIERTER LEBERZELLEN VON DER GLUCAGONKONZENTRATION

Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM für 6 Zellpräparationen angegeben. Die Ketonkörperbildung ist für die Inkubationsperiode zwischen der 30. und 40. Minute angegeben. Sonstige Versuchsbedingungen siehe Legende zu Abbildung 2.

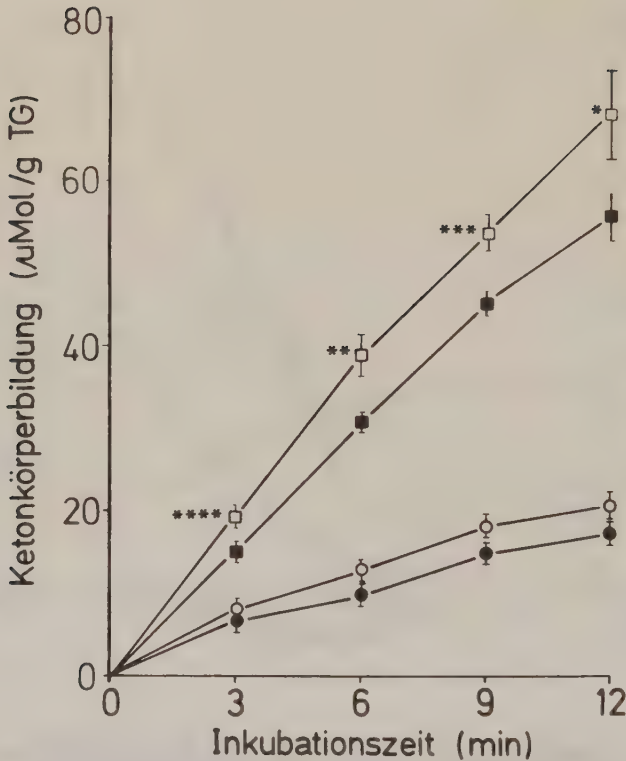


Abb. 4 KETONKÖRPERBILDUNG ISOLIERTER LEBERZELLEN GLUCAGONBEHANDELTEN RATTEN

Gefütterten Ratten wurden unter Nembutalanaesthesie 0,2 ml einer 0,2%igen Glucagonlösung (gelöst in 1,3% NaHCO_3) oder Lösungsmittel allein i.p. injiziert. Vor Entnahme der Leber zur Zellisolierung wurden dreimal 0,1 ml der gleichen Lösung im Abstand von 15 min injiziert. Die 1. Injektion von 0,2 ml erfolgte 1 h vor Schlachtung der Tiere. Die Zellen wurden in Ab- (●,○) oder Anwesenheit (■,□) von 0,66 mM Albumin-Oleat für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die offenen Symbole repräsentieren die Zellen Glucagon vorbehandelter Ratten, die geschlossenen Symbole die Zellen aus Kontrollratten. (n = 4)

7. Wirkung von cyclo-AMP auf Stoffwechselleistungen und Metabolitkompartimentierung isolierter Hepatozyten in Gegenwart von Laktat

7.1. Effekt des cyclo-AMP auf Glukoneogenese und Ketonkörperbildung isolierter Hepatozyten

Tabelle 15 zeigt die durch cyclo-AMP verursachten Veränderungen der Glukose- und Ketonkörperbildung isolierter Leberzellen bei Inkubation mit Laktat. Durch cyclo-AMP-Zugabe wurde die Glukosebildung um 65% gesteigert. Die 3-Hydroxybutyratbildung war um 240% gesteigert, während die Acetoacetatbildung um 24% gesenkt wurde. Dadurch stieg das 3-HOB/AcAc-Verhältnis von 0,26 auf 1,17.

7.2. Veränderungen der cytosolischen Metabolite von Hepatozyten 48 Stunden gehungerter Ratten durch cyclo-AMP

Ähnlich wie Glucagon führte cyclo-AMP im Cytosol zu einem Anstieg von Malat und Phosphoenolpyruvat und einem Abfall der C_5 -Dicarboxylate, wenn auch quantitative Unterschiede vorlagen (Tabelle 16). Anders als nach Glucagon fand sich nach cyclo-AMP ein Anstieg des cytosolischen ATP. Dies dürfte eine Folge der Spaltung von cyclo-AMP zu 5'-AMP durch die Phosphodiesterase sein, da Kontrollversuche mit 5'-AMP anstelle von cyclo-AMP ebenfalls einen Anstieg des cytosolischen Gehaltes von $7,21 \pm 0,18$ ($n = 4$) auf $9,63 \pm 0,95$ ($n = 4$) $\mu\text{Mol/g TG}$ ergaben ($P < 0,05$).

Tabelle 15

WIRKUNG VON CYCLO-AMP AUF GLUKONEOGENESE UND KETOGENESE
ISOLIERTER LEBERZELLEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN IN
GEGENWART VON LAKTAT

Isolierte Hepatozyten wurden 30 min in einer serumhaltigen Inkubationsmischung inkubiert. Dann wurde cyclo-AMP (0,1 mM Endkonzentration) zugesetzt und die Inkubation 10 min fortgesetzt. Die Laktatkonzentration betrug 8 mM. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. Anzahl der Zellpräparationen = 16. Die Bildungsraten beziehen sich auf die 10 min Periode zwischen der 30. und 40. Minute.

^aP < 0,05 ^bP < 0,0005

	Metabolitveränderung { μ Mol/g TG in 10 min }	
	Kontrolle	cyclo-AMP
Glukose	54,9 $\pm$ 3,9	90,8 $\pm$ 8,0 ^b
3-Hydroxybutyrat	1,8 $\pm$ 0,4	6,0 $\pm$ 0,7 ^b
Acetoacetat	6,7 $\pm$ 0,8	5,1 $\pm$ 0,9 ^a
3-HOB/AcAc	0,26	1,17

Tabelle 16

METABOLITVERÄNDERUNGEN IM CYTOSOL ISOLIERTER LEBERZELLEN
48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN NACH INKUBATION MIT CYCLO-
AMP

Versuchsbedingungen wie in Legende zu Tabelle 15 angegeben.

$a_P < 0,025$ $b_P < 0,01$ $c_P < 0,0005$

Metabolit	Gehalt (nMol/g TG)		cyclo-AMP- effekt(%)	Konzentration	
	Kontrolle	cyclo-AMP		Kontrolle	cyclo-AMP
ATP	7640+290 (7)	9240+320 ^b (7)	+21	5,54	6,70
ADP	1500+200 (7)	1870+230 (7)		1,09	1,36
Aspartat	2950+920 (4)	3630+690 (4)		2,14	2,63
Glutamat	11790+1320 (7)	8100+920 ^c (7)	-31	8,55	5,87
Citrat	880+260 (3)	380+180 (3)		0,64	0,28
2-Oxoglu- tarat	1560+110 (8)	770+ 60 (8)	-51	1,13	0,56
Malat	890+270 (4)	1310+180 ^a (4)	+47	0,65	0,95
Pyruvat	530+ 80 (6)	510+ 50 (6)		0,38	0,37
Phosphoenol- pyruvat	440+ 40 (16)	550+ 60 ^b (16)	+25	0,32	0,40
Glukose-6- Phosphat	170+ 7 (3)	250+ 20 (3)	+79	0,10	0,18

7.3. Veränderungen der mitochondrialen Metabolite von Hepatozyten 48 Stunden gehungerter Ratten durch cyclo-AMP

Wie Tabelle 17 zeigt, erhöhte cyclo-AMP die mitochondrialen Spiegel von ADP und Phosphoenolpyruvat um 14 bzw. 25%. Glutamat und 2-Oxoglutarat fielen um 28 und 48% ab. Ein Anstieg des mitochondrialen ATPs, wie er durch Glucagon verursacht wurde (Tabelle 12), war nach Inkubation mit cyclo-AMP nicht zu beobachten. Ebenfalls im Unterschied zu Glucagon führte cyclo-AMP zu einem Absinken des mitochondrialen Pyruvats um 46%.

Die Veränderung der Metabolitkonzentrationsgradienten über die mitochondriale Innenmembran durch cyclo-AMP ist in Tabelle 18 gezeigt. Die Konzentrationsgradienten von ATP, ADP, Aspartat, Glutamat, 2-Oxoglutarat, Malat und Phosphoenolpyruvat blieben durch cyclo-AMP unverändert, während der Gradient von Citrat steiler und der des Pyruvats abgeflacht wurde.

8. Zeitabhängigkeit der Glucagon- und cyclo-AMP-Effekte

Tabelle 19 zeigt, daß die Effekte von Glucagon bzw. cyclo-AMP auf die Glukoneogenese und die Ketonkörperbildung (mindestens) über 20 min erhalten blieb. Die charakteristische Erhöhung des Redoxgrades der mitochondrialen Pyridinnukleotide, gemessen am 3-HOB/AcAc-Verhältnis, ist jedoch nach 10 min Inkubation mit Glucagon oder cyclo-AMP wesentlich ausgeprägter, als nach 20 min.

Tabelle 17

METABOLITVERÄNDERUNGEN IM MITOCHONDRIALEN RAUM ISOLIERTER
LEBERZELLEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN NACH INKUBATION
MIT CYCLO-AMP

Versuchsbedingungen wie in Legende zu Tabelle 15 angegeben.

$^a P < 0,05$ $^b P < 0,0125$ $^c P < 0,0005$

Metabolit	Gehalt (nMol/g TG)		cyclo-AMP-	Konzentration	
	Kontrolle	cyclo-AMP	effekt (%)	Kontrolle	cyclo-AMP
ATP	2360 ± 140 (7)	2340 ± 150 (7)		14,26	14,14
ADP	1460 ± 100 (7)	1660 ± 110 ^a (7)	+14	8,82	10,03
Aspartat	220 ± 80 (4)	210 ± 70 (4)		1,33	1,27
Glutamat	3650 ± 380 (7)	2630 ± 280 ^c (7)	-28	22,05	15,89
Citrat	1080 ± 190 (4)	1290 ± 290 (4)		6,53	7,79
2-Oxoglu- tarat	210 ± 40 (8)	110 ± 20 ^b (8)	-48	1,27	0,66
Malat	170 ± 60 (4)	190 ± 70 (4)		1,03	1,15
Pyruvat	260 ± 50 (6)	140 ± 30 ^a (6)	-46	1,57	0,85
Phosphoenol- pyruvat	320 ± 30 (16)	400 ± 40 ^a (16)	+25	1,93	2,42
Glukose-6- phosphat	0	0			

Tabelle 18

WIRKUNG VON CYCLO-AMP AUF DAS VERHÄLTNIS DER METABOLIT-KONZENTRATIONEN IM MITOCHONDRIALEN (m) UND CYTOSOLISCHEN (c) RAUM UND AUF DEN CYTOSOLISCHEN ANTEIL AM ZELLULÄREN METABOLITGEHALT

Die Gradienten wurden aus den Daten der Tabellen 16 und 17 errechnet. Näheres siehe dort.

Metabolit	Konzentrations- gradient (m/c)		Cytosolischer Teil in % des zellulären Metabolitgehalts	
	Kontrolle	cyclo- AMP	Kontrolle	cyclo- AMP
ATP	2,6	2,1	76,4	79,8
ADP	8,1	7,4	50,7	53,0
Aspartat	0,6	0,5	93,1	94,5
Glutamat	2,6	2,7	76,4	75,5
Citrat	10,2	27,8	44,9	22,8
2-Oxoglutarat	1,1	1,2	88,1	87,5
Malat	1,6	1,2	84,0	87,3
Pyruvat	4,1	2,3	67,1	78,5
Phosphoenol- pyruvat	6,0	6,1	57,9	57,9

Tabelle 19

ZEITABHÄNGIGKEIT DER GLUCAGON- UND CYCLO-AMP-WIRKUNGEN AUF GLUKONEOGENESE UND KETOGENESE ISOLIERTER HEPATOZYTEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN IN GEGENWART VON LAKTAT

Hepatozyten wurden 30 min in einer serumhaltigen Inkubationsmischung inkubiert. Dann wurde Glucagon (7 µg/ml) oder cyclo-AMP (0,1 mM Endkonzentration) zugegeben und die Inkubation 10 bzw. 20 min fortgesetzt. Die Laktatkonzentration betrug 8 mM. Es sind Mittelwerte + SEM und in Klammern die Anzahl der Zellpräparationen angegeben. $p < 0,05$

	Metabolitveränderung { µmol/g TG in x min }					
	10 min			20 min		
	Kontrolle	Glucagon	cyclo-AMP	Kontrolle	Glucagon	cyclo-AMP
Glukose	53,5±8,4 (5)	88,3±6,3 ^a (5)	65,5±9,9 (5)	86,6±22,8 (5)	162,2±11,2 ^a (5)	131,6±27,0 ^a (5)
3-Hydroxy- butyrat	4,5±2,1 (5)	11,9±2,9 ^a (5)	8,9±1,7 (5)	4,3±1,5 (5)	16,7±2,4 ^a (4)	17,6 (2)
Aceto- acetat	5,8±2,6 (5)	1,6±0,5 (5)	6,1±2,8 (3)	9,0±1,3 (5)	7,5±1,7 (5)	10,7±3,1 (5)
3-HOB+AcAc	10,3	13,5	15,0	13,2	24,3	28,2
3-HOB/AcAc	0,77	7,69	1,47	0,47	2,22	1,65

Die Zeitabhängigkeit der Glucagon- bzw. cyclo-AMP-Effekte auf die subzelluläre Verteilung von ATP und ADP ist in Tabelle 20 dargestellt. In Übereinstimmung mit den in Tabelle 12 und 13 gezeigten Daten erhöhte Glucagon nach 10 min den mitochondrialen- und senkte den cytosolischen ATP-Spiegel. Diese Veränderungen waren auch nach 20 min noch deutlich zu sehen. Cyclo-AMP beeinflusste auch nach 20 min Inkubation den mitochondrialen ATP-Gehalt nicht, während der cytosolische ATP-Spiegel zu diesem Zeitpunkt signifikant erhöht war.

Tabelle 21 gibt die Ergebnisse von Experimenten wieder, in denen die Wirkung einer Kombination von Glucagon und cyclo-AMP auf die Glukoneogenese aus Laktat untersucht wurde. Wie man sieht, liegt eine additive Wirkung der beiden Effektoren nicht vor, woraus man schließen könnte, daß ihnen derselbe Regulationsmechanismus zugrunde liegt.

9. Glucagon-Effekte im Biotinmangel

Die folgenden Untersuchungen hatten zum Ziel, die Pyruvatcarboxylase auszuschalten und zu sehen, welche Auswirkungen das Fehlen dieses Schlüsselenzyms der Glukoneogenese auf die Stoffwechselwirkungen des Glucagons hat.

9.1. Wirkung einer Biotinmangel-Diät auf die Leber-Pyruvatcarboxylase

Füttert man Ratten über eine längere Zeit mit einer biotinfreien, an Roheiweiß reichen Diät (68), so beträgt die Aktivität der Pyruvatcarboxylase der Leber nach 6-7 Wochen

Tabelle 2o

ZEITABHÄNGIGKEIT DER GLUCAGON- UND CYCLO-AMP-WIRKUNGEN AUF DIE SUBZELLULÄRE VERTEILUNG VON ATP UND ADP IN HEPATOZYTEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN IN GEGENWART VON LAKTAT

Versuchsbedingungen wie in Legende zu Tabelle 19 angegeben.

$a_p < 0,05$ $b_p < 0,01$ $c_p < 0,005$

Metabolit	Inkubations- zeit (min)	Mitochondrialer Gehalt {nMol/g TG}		Cytosolischer Gehalt {nMol/g TG}	
		Kontrolle	Glucagon	cyclo-AMP	cyclo-AMP
ATP	1o	200o+12o (5)	291o+31o ^a (4)	217o+33o (5)	769o+39o (5)
ADP	1o	193o+20o (5)	213o+26o (4)	210o+21o (5)	1o5o+25o (5)
ATP/ADP	1o	1,04	1,37	1,03	7,32
ATP	2o	198o+4o (5)	292o+7o ^a (5)	252o+20o (5)	820o+47o (5)
ADP	2o	195o+17o (5)	228o+13o (5)	231o+10o (5)	81o+27o (5)
ATP/ADP	2o	1,02	1,28	1,09	10,12
					5,64
					8,54
					5,01
					4,6o
					571o+28o ^c (4)
					826o+11o (5)
					124o+22o (4)
					165o+27o (5)
					632o+21o ^c (5)
					922o+56o ^b (5)
					112o+22o (5)
					1o8o+31o (5)

Tabelle 21

DIE WIRKUNG EINER KOMBINATION VON GLUCAGON UND CYCLO-AMP AUF DIE GLUKONEOGENESE IN HEPATOZYTEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN IN GEGENWART VON 8mM LAKTAT

Hepatozyten wurden 30 min inkubiert. Dann wurde Glucagon (7,ug/ml) oder cyclo-AMP (0,1 mM Endkonzentration) oder beide zugegeben und die Inkubation 10 min fortgesetzt. Die Glukosebildung bezieht sich auf die Zeit zwischen der 30. und 40. Minute. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM von vier Zellpräparationen angegeben. $^a p < 0,01$

Effektor	Glukosebildung { μ Mol/g TG in 10 min}
Kontrolle	37,0 $\pm$ 8,0
Glucagon	84,0 $\pm$ 12,3 ^a
cyclo-AMP	77,7 $\pm$ 14,6 ^a
Glucagon plus cyclo-AMP	75,7 $\pm$ 12,3 ^a

nur noch 1/10 der Aktivität normalgefütterter bzw. Biotin-substituierter Ratten (Abbildung 5) (70). Führt man den Ratten Biotin zu (200,ug i.p.), so steigt die Pyruvatcarboxylase wieder an und erreicht innerhalb einiger Stunden den Normalwert (Abbildung 6) (70).

9.2. Wirkung von Glucagon auf die Glukoneogenese aus Laktat bzw. Glutamin im Biotinmangel (64)

Im Biotinmangel war die Glukosebildung der Hepatozyten aus Laktat um ca. 60% reduziert und nicht mehr durch Glu-

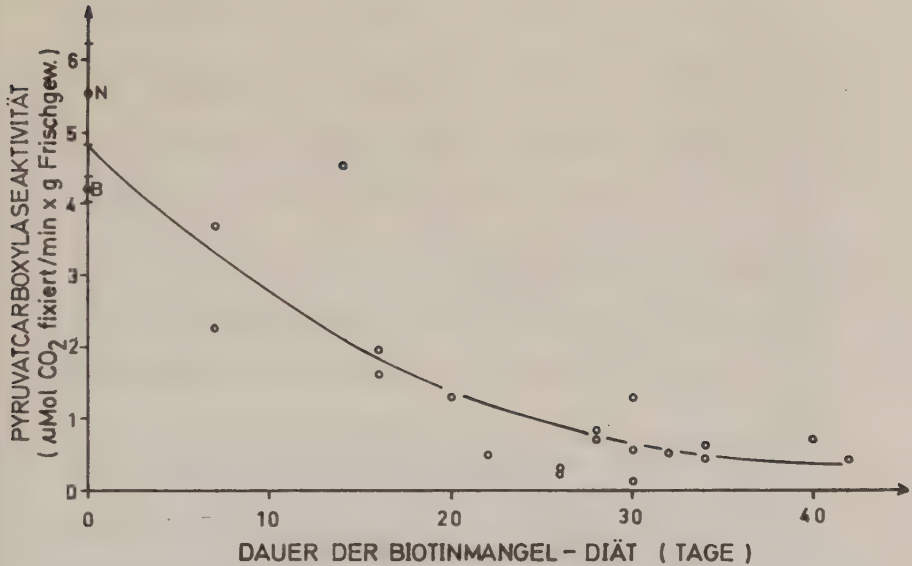


Abb. 5 ABHÄNGIGKEIT DER RATTENLEBER-PYRUVATCARBOXYLASE-AKTIVITÄT VON DER DAUER DER ERNÄHRUNG MIT BIOTIN-FREIER DIÄT

40-60 g schwere Ratten wurden die angezeigte Zeitdauer mit einer biotinfreien Diät ernährt. Unter Nembutalnarkose wurden ihnen Teile der Leber nach dem Frierstoppverfahren entnommen (69). Die Aktivität der Pyruvatcarboxylase wurde wie im Methodenteil angegeben bestimmt. (°N) Pyruvatcarboxylaseaktivität in der Leber von Normalratten. (°B) Pyruvatcarboxylaseaktivität in der Leber von Biotinmangelratten, die einmal je Woche eine Injektion von 0,2 ml Biotin ($\approx 200 \mu\text{g}$) i.p. erhielten.

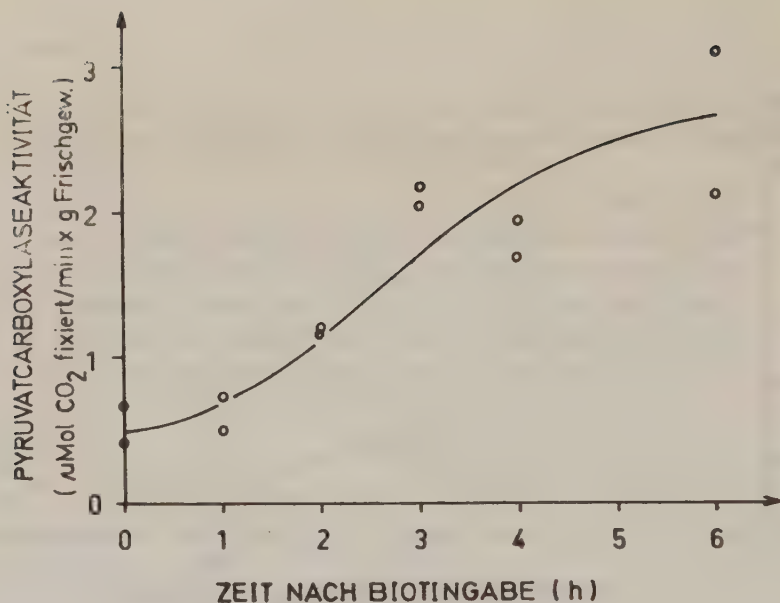


Abb. 6 ABHÄNGIGKEIT DER PYRUVATCARBOXYLASEAKTIVITÄT DER LEBER VON BIOTINMANGELRATTEN VON DER DAUER DER BIOTINSUBSTITUTION

Anfänglich 40 g schwere Ratten wurden 30 Tage bei biotinfreier Diät gehalten. Dann wurde ihnen 200, μg Biotin (gelöst in 0,2 ml 0,9%NaCl) injiziert und nach den angegebenen Zeiten in Nembutalnarkose die Leber nach dem Friestoppverfahren entnommen. Die Aktivität der Pyruvatcarboxylase wurde wie im Methodenteil angegeben gemessen.

cagon stimulierbar (Tabelle 22). Wurden den Biotinmangelratten 14 h vor Zellisolierung 200 μ g Biotin i.p. injiziert, so war die Laktat-Glukoneogenese nahezu normal und durch Glucagon im gleichen Maß stimulierbar, wie in Hepatozyten normaler 48 h gehungerter Ratten. Tabelle 22 zeigt weiterhin, daß die Glukoneogenese aus Glutamin erwartungsgemäß im Biotinmangel unverändert war und durch Glucagon in gleicher Weise wie in normalen oder biotinsubstituierten Hepatozyten gesteigert wurde.

9.3. Glucagonwirkung auf die Ketogenese in Hepatozyten aus Biotinmangelratten (64)

Die Wirkung von Glucagon auf die Ketonkörperbildung in Biotinmangel-Hepatozyten ist auf Tabelle 23 gezeigt. Es fällt auf, daß die basale Ketonkörperbildung der Biotinmangelzellen im Vergleich zu Zellen biotinsubstituierter Ratten ($2,7 \pm 0,5$ μ Mol/g TG in 10 min, n = 3) oder zu normalen Leberzellen (Tabelle 11) um das 3-5fache gesteigert ist. Diese Steigerung betrifft in erster Linie 3-Hydroxybutyrat und führt zu einem auffallend hohen Quotienten von 3-HOB/AcAc. Trotzdem führte Glucagon zu einer weiteren Stimulierung der Ketonkörperbildung und erhöhte das 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Verhältnis extrem von 10 auf 32.

Tabelle 22

EINFLUSS VON GLUCAGON AUF DIE GLUKONEOGENESE ISOLIERTER HEPATOZYTEN NORMALER UND BIOTINMANGEL RATTEN

Hepatozyten wurden 30 min in einer serumhaltigen Inkubationsmischung mit 8 mM Laktat oder 8 mM Glutamin inkubiert. Dann wurde Glucagon ($0,5 \mu\text{g/ml}$) zugegeben und die Inkubation 10 min fortgesetzt. Die Metabolitveränderungen beziehen sich auf den Zeitraum zwischen der 30. und 40. Minute. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM und in Klammern die Anzahl der Zellpräparationen angegeben. Normale Ratten wurden 48 h gehungert, Biotinmangelratten 24 h, um Hypoglykämien zu vermeiden. $a_p < 0,05$ $b_p < 0,01$ $c_p < 0,0025$

Behandlung der Tiere	Glukosebildung $\left\{ \frac{\mu\text{Mol/g TG in 10 min}}{\mu\text{Mol/g TG in 10 min}} \right\}$			
	Kontrolle	Laktat Glucagon	Kontrolle	Glutamin Glucagon
Biotinmangel diät ($0,55 \pm 0,09$ n=13) +	$24,3 \pm 2,5$ (12)	$21,4 \pm 2,1$ (12)	$27,7 \pm 4,1$ (8)	$49,7 \pm 11,2^a$ (8)
Biotinmangel diät + $200 \mu\text{g}$ Biotin 14 h vor Zellisolierung	$33,1 \pm 7,2$ (6)	$95,1 \pm 8,4^c$ (6)	$25,9 \pm 5,8$ (5)	$60,2 \pm 7,1^b$ (5)
Normale Diät ($5,53 \pm 0,7$ n=6) +	$54,8 \pm 5,9$ (5)	$108,7 \pm 8,3^c$ (5)	$20,8 \pm 5,3$ (6)	$42,2 \pm 7,6^c$ (6)

+ Pyruvatcarboxylaseaktivität in gefriergestoppter Leber nicht gehungerter Tiere in $\mu\text{Mol CO}_2$ fixiert/min pro g Frischgewicht. n = Anzahl der Tiere. Die Pyruvatcarboxylaseaktivität der Hepatozyten aus Biotinmangelratten betrug $0,68 \pm 0,08 \mu\text{Mol CO}_2$ fixiert/min pro g Frischgewicht. (n = 11).

Tabelle 23

WIRKUNG VON GLUCAGON AUF DIE KETONKÖRPERBILDUNG IN HEPATOZYTEN AUS BIOTINMANGELRATTEN

Leberzellen wurden 30 min inkubiert, dann wurde Glucagon ($0,5 \mu\text{g/ml}$) zugegeben und die Inkubation 10 min fortgesetzt. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM für fünf verschiedene Zellpräparationen angegeben. Die Inkubationsmischung enthielt Serum und zu Beginn 12 mM Laktat. Die Pyruvatcarboxylaseaktivität der Leberzellen betrug $0,55 \pm 0,09 \mu\text{Mol CO}_2 \text{ fixiert/min pro g Frischgewicht}$ ($n = 4$).

$$^a p < 0,05 \quad ^b p < 0,01$$

	Metabolitveränderung { $\mu\text{Mol/g TG in 10 min}$ }		$\frac{3\text{-HOB}}{\text{AcAc}}$
	Acetoacetat	3-Hydroxybutyrat	
Kontrolle	$1,4 \pm 0,27$	$14,7 \pm 4,4$	10
Glucagon $0,5 \mu\text{g/ml}$	$0,7 \pm 0,2^a$	$23,4 \pm 4,6^b$	32

9.4. Wirkung des Glucagon auf zelluläre und mitochondriale Metabolitgehalte von Hepatozyten aus Biotinmangelratten (64)

Mit der Entwicklung des Biotinmangels fielen die zellulären Gehalte von Malat, Citrat, Glutamat, 2-Oxoglutarat und Phosphoenolpyruvat ab, sodaß sie schließlich nur mehr 37, 30, 40, 37 bzw. 32% der Normalwerte (Tabelle 2) betrugen (Tabelle 24). Diese Erniedrigung erfolgte parallel zur Abnahme der Pyruvatcarboxylaseaktivität. So betrugen bei einer PC-Aktivität von $1,5 \mu\text{Mol CO}_2 \text{ fixiert/min pro g Frischgewicht}$ die zellulären Gehalte von Malat

Tabelle 24

GLUCAGONWIRKUNG AUF DIE METABOLITGEHALTE ISOLIERTER HEPATOZYTEN AUS BIOTINMANGELRATTEN

Die Zellpräparationen und die Inkubationsbedingungen waren mit den in Tabelle 23 beschriebenen identisch. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM und in Klammern die Anzahl der Zellpräparationen angegeben.

$a_p < 0,025$ $b_p < 0,01$ $c_p < 0,0025$

	2-Oxoglutarat	Metabolitgehalt $\left\{ \frac{\mu\text{Mol}}{\text{g TG}} \right\}$			Phosphoenolpyruvat
		Glutamat	Malat	Citrat	
Kontrolle	$0,82 \pm 0,12$ (5)	$5,4 \pm 0,9$ (5)	$0,37 \pm 0,04$ (5)	$0,55 \pm 0,04$ (4)	$0,25 \pm 0,03$ (5)
Glucagon (0,5 $\mu\text{g/ml}$)	$0,31 \pm 0,03^c$ (5)	$2,5 \pm 0,5^b$ (5)	$0,36 \pm 0,06$ (5)	$0,44 \pm 0,11$ (4)	$0,15 \pm 0,02^a$ (5)

$0,59 \pm 0,05$ $\mu\text{Mol/g TG}$, von 2-Oxoglutarat $1,24 \pm 0,25$ $\mu\text{Mol/g TG}$ und von Phosphoenolpyruvat $0,48 \pm 0,04$ $\mu\text{Mol/g TG}$ ($n=3$), während bei einer Pyruvatcarboxylaseaktivität von $0,55$ $\mu\text{Mol CO}_2$ fixiert/min pro g Frischgewicht nur mehr die in Tabelle 24 aufgeführten Werte gefunden wurden. Wie die Tabelle weiterhin zeigt, wurden die niedrigen Spiegel von 2-Oxoglutarat und Glutamat durch Glucagon noch weiter gesenkt, entsprechend der Glucagonwirkung auf die C_5 -Dicarboxylate in normalen isoliert perfundierten Lebern (71,11) und in normalen Hepatozyten (Tabellen 12 und 13). Im Gegensatz zu Hepatozyten mit intakter Pyruvatcarboxylase führte Glucagon in Biotinmangel-Hepatozyten zu keiner Erhöhung der Malat- und Citratspiegel (Tabelle 24), der zelluläre Gehalt von Phosphoenolpyruvat wurde durch Glucagon sogar gesenkt. Der mitochondriale Phosphoenolpyruvatgehalt von Biotinmangel-Hepatozyten betrug $0,1 \pm 0,04$ $\mu\text{Mol/g TG}$ ($n=4$) und blieb durch Glucagon unverändert, dagegen wurde der cytosolische Gehalt signifikant erniedrigt.

9.5. Glucagonwirkung auf die Glukoneogenese aus Dihydroxyaceton oder Fruktose im Biotinmangel

In der perfundierten Leber (32,72) und in isolierten Hepatozyten (176,73) mit intakter Pyruvatcarboxylase stimuliert Glucagon die Glukoneogenese aus Dihydroxyaceton und Fruktose, wenn diese in niedrigen Konzentrationen eingesetzt werden. Wie Abbildung 7 zeigt, konnte dies in eigenen

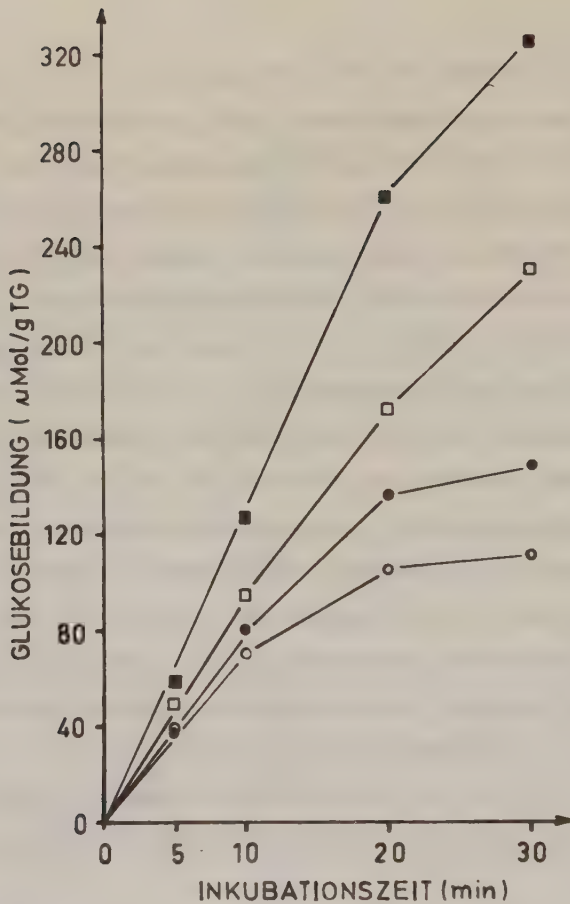


Abb. 7 GLUCAGONWIRKUNG AUF DIE GLUKOSEBILDUNG AUS 4 mM DIHYDROXYACETON ODER 4 mM FRUKTOSE IN HEPATOZYTEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN

Hepatozyten 48 h gehungerter Ratten wurden die angegebenen Zeiten mit 4 mM Dihydroxyaceton (○,●) oder 4 mM Fruktose (□,■) in einem Inkubationsmedium, bestehend aus 1 ml KHB-G mit 2 mM Lysin, 0,1 ml Albumin/NaCl, 0,01 ml 110 mM CaCl_2 , 0,05 ml Substrat und 0,2 ml Hepatozyten in KHB-G mit 2 mM Lysin, inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 0,2 ml des Inkubationsansatzes mit 0,04 ml 70% HClO_4 gestoppt. In den neutralisierten Extrakten wurde die gebildete Glukose bestimmt. Es sind die Ergebnisse eines Experiments angegeben. Die ausgefüllten Symbole zeigen die Glukosebildung in Gegenwart von Glucagon.

Versuchen bestätigt werden.

Um zu ermitteln, ob diese Stimulierung auf eine mitochondriale oder cytosolische Wirkung des Glucagon zurückzuführen ist, wurde die Glukoneogenese aus Dihydroxyaceton und Fruktose in Hepatozyten aus Biotinmangelratten studiert. Abbildung 8 und 9 zeigen, daß die Glukosebildung sowohl aus Dihydroxyaceton als auch aus Fruktose auch in Biotinmangelzellen durch Glucagon stimuliert wird, während die Glukosebildung aus endogenem Substrat bzw. aus Laktat in den gleichen Hepatozyten nicht durch Glucagon stimuliert wurde (Abbildung 10 bzw. 11).

10. Effekte von Oleat auf Stoffwechselleistungen und die subzelluläre Metabolitverteilung isolierter Hepatozyten 48 Stunden gehungerter Ratten

Oleat stimuliert in der Leber die Glukoneogenese aus Laktat und aus Pyruvat (61,62,74-78). Davon ausgehend wurde ursprünglich angenommen, daß Glucagon durch Steigerung des Fettsäureangebots infolge Aktivierung der hepatischen Lipolyse die Glukoneogenese stimuliert (61,62,74,79,80). Dies wurde jedoch unwahrscheinlich, als sich zeigte, daß Glucagon auch in Anwesenheit maximal stimulierender Fettsäurekonzentrationen die Glukosebildung weiter steigern kann (81,82). Zudem zeigten Fröhlich und Wieland (83), daß Glucagon auch dann die Glukoneogenese stimuliert, wenn die Leberlipolyse durch Glycodiazin gehemmt worden war. Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß Glucagon und Fettsäuren über verschiedene Mechanismen die Glukoneogenese stimulieren.

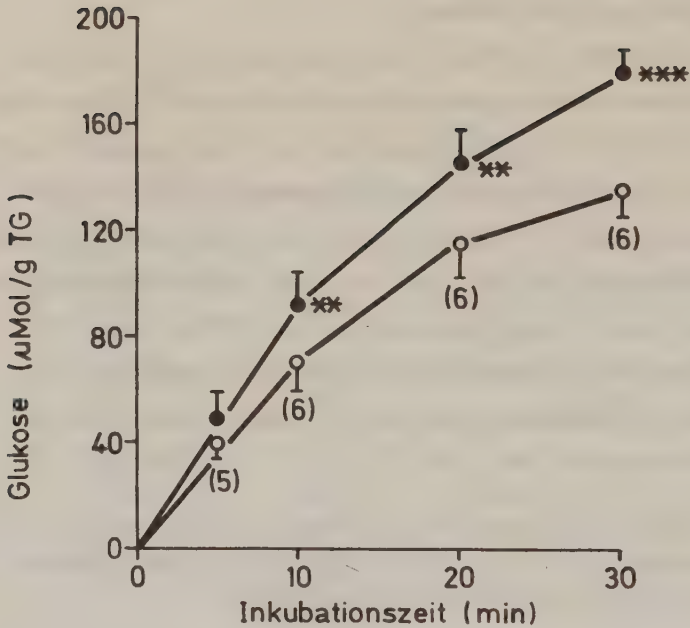


Abb. 8 GLUCAGONWIRKUNG AUF DIE GLUKOSEBILDUNG AUS 4 mM DIHYDROXYACETON IN HEPATOZYTEN AUS BIOTINMANGEL-RATTEN

Hepatozyten 24 h gehungerter Biotinmangelratten wurden wie in Abbildung 7 angegeben inkubiert. Die Pyruvatcarboxylaseaktivität der Hepatozyten betrug $0,57 \pm 0,29$ µMol CO_2 fixiert/min pro g Frischgewicht. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM gezeichnet. In Klammern ist die Zahl der Zellpräparationen angegeben.

* $P < 0,0125$ ** $P < 0,005$

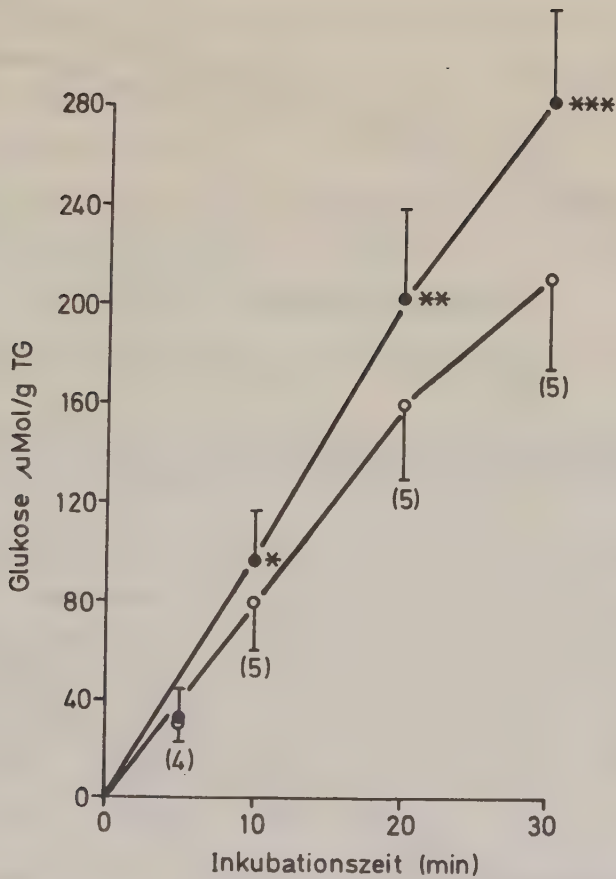


Abb. 9 GLUCAGONWIRKUNG AUF DIE GLUKOSEBILDUNG AUS 4 mM FRUKTOSE IN HEPATOZYTEN AUS BIOTINMANGELRATTEN

Experimentelle Details siehe Abbildung 8.

* $P < 0,05$ ** $P < 0,0125$ *** $P < 0,005$

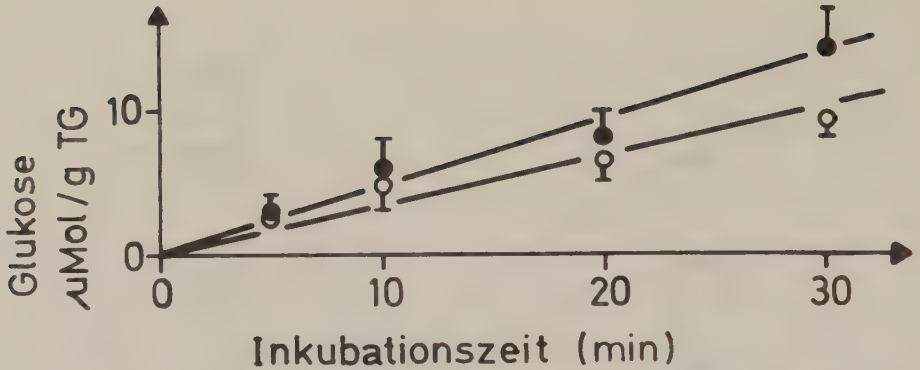


Abb. 10 GLUCAGONWIRKUNG AUF DIE GLUKOSEBILDUNG AUS ENDOGENEM SUBSTRAT IN HEPATOZYTEN AUS BIOTINMANGELRATTEN

Experimentelle Details siehe Abb. 8. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 4 Zellpräparationen angegeben.

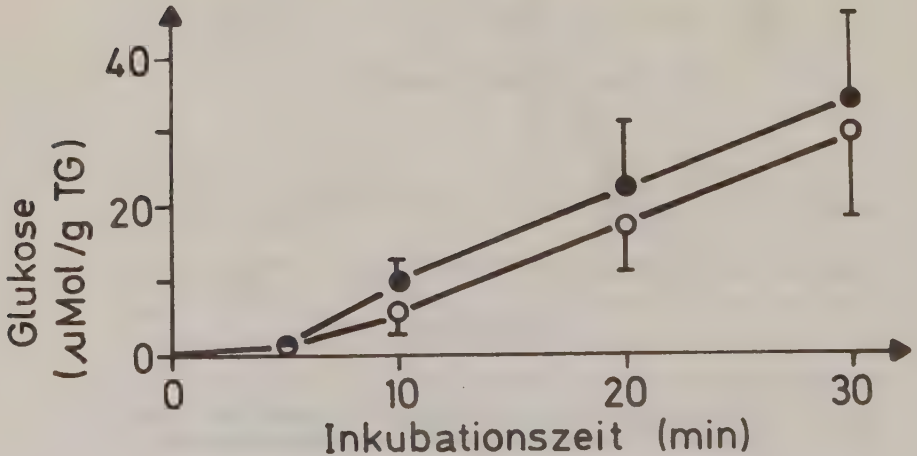


Abb. 11 GLUCAGONWIRKUNG AUF DIE GLUKOSEBILDUNG AUS 10 mM LAKTAT IN HEPATOZYTEN AUS BIOTINMANGELRATTEN

Experimentelle Details siehe Abb. 8. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 3 Zellpräparationen angegeben.

Zur weiteren Differenzierung der Wirkung von Oleat und Glucagon wurde untersucht, ob Oleat die gleichen Wirkungen auf die subzelluläre Verteilung von Lebermetaboliten zeigt, wie das Hormon.

10.1. Oleateffekte auf Stoffwechselleistungen und Metabolitkompartimentierung in Hepatozyten in Gegenwart von Laktat

Tabelle 25

WIRKUNG VON OLEAT AUF GLUKONEOGENESE UND KETONKÖRPERBILDUNG ISOLIERTER HEPATOZYTEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN IN GEGENWART VON LAKTAT

Isolierte Hepatozyten wurden 30 min in einer serumhaltigen Inkubationsmischung in Gegenwart von 8 mM Laktat inkubiert. Dann wurde Albumin-Oleat (0,7 mM Endkonzentration) zugegeben und die Inkubation 10 min fortgesetzt. Die Bildungsraten beziehen sich auf den Zeitraum zwischen der 30. und 40. Minute. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM von acht Zellpräparationen angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit Students t-Test für unverbundene Stichproben berechnet.

^a_P < 0,0025 ^b_P < 0,0005

Substrat	Metabolitveränderung { $\mu\text{Mol/g TG in 10 min}$ }		
	Glukose	Acetoacetat	3-Hydroxybutyrat
Laktat	54,1 $\pm$ 6,3	10,6 $\pm$ 0,9	4,2 $\pm$ 1,1
Laktat plus Oleat	86,4 $\pm$ 5,9 ^a	25,2 $\pm$ 3,1 ^b	67,0 $\pm$ 2,9 ^b

Wie Tabelle 25 zeigt, wurde die Glukosebildung durch Oleat um 60% gesteigert, während die Acetoacetat- und 3-Hydroxybutyratproduktion auf das 2- bzw. 16-fache anstieg. Der 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotient stieg dabei von 0,4 auf 2,7 an.

Tabelle 26 faßt die Veränderungen der subzellulären Metabolitverteilung in Hepatozyten unter der Wirkung von Oleat zusammen. Wie man sieht, waren - anders als nach Glucagon, das nur den cytosolischen Malatspiegel erhöhte (vgl. Tabelle 12 und 13) - die mitochondrialen und cytosolischen Spiegel von Malat und Citrat durch Oleat erhöht. Ebenfalls im Gegensatz zur Glucagonwirkung blieben die ATP- und 2-Oxoglutaratspiegel in beiden Kompartimenten unverändert. Der mitochondriale Glutamatgehalt war sogar etwas erhöht, während der Phosphoenolpyruvatgehalt des gleichen Kompartiments durch Oleat erniedrigt wurde.

10.2. Differenzierung der Wirkung von Oleat und Glucagon auf Glukoneogenese, Ketogenese und zelluläre Metabolitgehalte von Hepatozyten in Gegenwart von Laktat (59)

Tabelle 27 zeigt, daß die Effekte von Glucagon und Oleat auf die Glukosebildung, sowie auf die Acetoacetat- und 3-Hydroxybutyratbildung additiv sind. Das 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Verhältnis wurde durch Glucagon auch in Anwesenheit von Oleat bzw. Oleat und Alanin von 3,9 auf 10,8 bzw. von 2,5 auf 6,4 erhöht.

Tabelle 26

WIRKUNG VON OLEAT AUF DIE METABOLITKOMPARTIMENTIERUNG ISOLIERTER HEPATOZYTEN 48 STUNDEN
GEHUNGERTER RATTEN IN GEGENWART VON LAKTAT

Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Tabelle 25 beschrieben. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM und in Klammern die Anzahl der verschiedenen Zellpräparationen angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit Student t-Test für unverbundene Stichproben berechnet.

$a_p < 0,05$ $b_p < 0,0025$ $c_p < 0,0005$

Metabolit	Mitochondrialer Gehalt ($\mu\text{mol/g TG}$)		Cytosolischer Gehalt ($\mu\text{mol/g TG}$)	
	8 mM Laktat	8 mM Laktat plus 0,7 mM Oleat	8 mM Laktat	8 mM Laktat plus 0,7 mM Oleat
ATP	1,99 $\pm$ 0,16 (7)	2,26 $\pm$ 0,27 (7)	7,68 $\pm$ 0,62 (7)	7,93 $\pm$ 0,59 (7)
Glutamat	3,0 $\pm$ 0,36 (6)	4,37 $\pm$ 0,74 ^a (4)	12,18 $\pm$ 2,60 (6)	14,41 $\pm$ 2,98 (4)
Citrat	1,10 $\pm$ 0,09 (6)	1,66 $\pm$ 0,12 ^b (5)	0,70 $\pm$ 0,10 (5)	1,37 $\pm$ 0,17 ^a (5)
2-Oxoglutarat	0,33 $\pm$ 0,12 (7)	0,25 $\pm$ 0,09 (7)	1,24 $\pm$ 0,12 (7)	1,13 $\pm$ 0,14 (7)
Malat	0,13 $\pm$ 0,03 (6)	0,34 $\pm$ 0,05 ^b (5)	0,84 $\pm$ 0,11 (6)	1,89 $\pm$ 0,16 ^c (5)
Phosphoenol- pyruvat	0,30 $\pm$ 0,03 (7)	0,22 $\pm$ 0,04 ^a (7)	0,31 $\pm$ 0,04 (7)	0,21 $\pm$ 0,05 (7)

Die unterschiedlichen Effekte von Glucagon und Oleat auf zelluläre Metabolitgehalte sind in Tabelle 28 zusammengefaßt. So erniedrigt Glucagon auch in Anwesenheit von Oleat bzw. Oleat plus Alanin den zellulären Glutamatgehalt, während Oleat allein diesen erhöht. Bei zusätzlicher Anwesenheit von Alanin wird der zelluläre Glutamatgehalt durch Oleat noch stärker erhöht.

Die Erniedrigung des 2-Oxoglutaratgehaltes durch Glucagon war auch in Anwesenheit von Oleat zu beobachten und trat auch dann ein, wenn der 2-Oxoglutaratgehalt durch Alanin schon stark abgefallen war.

Der Phosphoenolpyruvatspiegel wurde durch Glucagon auch in Gegenwart von Oleat erhöht. Lediglich in der Substratkombination Oleat plus Alanin vermochte das Hormon nicht mehr den bereits erhöhten Phosphoenolpyruvatspiegel weiter zu steigern.

10.3. Differenzierung der Wirkung von Oleat und Glucagon auf Glukoneogenese und Ketogenese isolierter Hepatozyten in Gegenwart von Glutamin

Oleat steigert die Glukoneogenese aus 5 mM Glutamin nicht (Tabelle 29). Ähnliche Ergebnisse wurden in Gegenwart von 10 mM Glutamin erhalten (Ergebnisse nicht gezeigt). Wie Tabelle 29 weiter zeigt, wurde die Glukoneogenese aus Glutamin durch Glucagon auch in Anwesenheit von Oleat stimuliert. Ferner führte Glucagon zu einer Erhöhung des 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten, ähnlich wie in Leberzellen, die mit Laktat inkubiert wurden (Tabelle 11).

Tabelle 28

UNTERSCHIEDLICHE WIRKUNGEN VON OLEAT UND GLUCAGON AUF DIE ZELLULÄREN GLUTAMAT-, 2-OXOGLUTARAT- UND PHOSPHOENOLPYRUVAT-GEHALTE ISOLIERTER HEPATOZYTEN

Die Inkubationsbedingungen waren die gleichen, wie sie in der Legende zu Tabelle 27 beschrieben wurden. ^ap < 0,05 gegen Kontrolle ohne Oleat. ^bp < 0,05 gegen Kontrolle ohne Glucagon.

Substrat	Konz. (mM)	Metabolitgehalt (µmol/g TG)			
		Glutamat		2-Oxoglutarat	
		Kontrolle	Glucagon	Kontrolle	Glucagon
Laktat	12	15,8±1,1	6,1±0,8 ^b	2,21±0,13	0,62±0,1 ^b
Laktat plus Oleat	12 0,7	20,9±1,7 ^a	12,9±3,2 ^b	1,76±0,21 ^a	0,49±0,09 ^b
Laktat plus Alanin plus Oleat	12 3,3 0,7	38,3±2,3 ^a	19,4±1,5 ^b	0,79±0,14 ^a	0,42±0,16 ^b
				0,79±0,07	1,40±0,12 ^b
				0,71±0,04	1,44±0,20 ^b
				1,19±0,13 ^a	1,17±0,23

Tabelle 29

UNTERSCHIEDLICHE WIRKUNGEN VON OLEAT UND GLUCAGON AUF GLUKONEOGENESE UND KETOGENESE IN HEPATOZYTEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN IN GEGENWART VON GLUTAMIN

Hepatozyten wurden in einer serumhaltigen Inkubationsmischung 30 min mit 5 mM Glutamin inkubiert. Dann wurde Glucagon (7, μ g/ml) bzw. Oleat (0,7 mM Endkonzentration) zugegeben und die Inkubation 10 min fortgesetzt. Die Metabolitveränderungen beziehen sich auf die Zeit zwischen der 30. und 40. Minute. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM für vier Zellpräparationen angegeben.

Metabolit	Metabolitveränderung { μ Mol/g TG in 10 min }			
	Kontrolle	Glucagon	Oleat	Oleat plus Glucagon
Glukose	50,6 $\pm$ 9,8	83,2 $\pm$ 14,1	37,7 $\pm$ 7,3	72,3 $\pm$ 18,2
Aceto- acetat	13,8 $\pm$ 2,1	9,3 $\pm$ 0,8	10,3 $\pm$ 1,1	7,9 $\pm$ 1,6
3-Hydroxy- butyrat	7,1 $\pm$ 1,1	12,6 $\pm$ 3,1	92,4 $\pm$ 9,6	94,3 $\pm$ 9,8
3-HOB+AcAc	20,9	21,9	102,8	102,2
3-HOB/AcAc	0,5	1,4	8,9	12,0

10.4. Oleatwirkungen in Hepatozyten aus Biotinmangelratten

Tabelle 30 zeigt die Wirkung von Oleat auf die Kompartimentierung von Malat und Citrat. Der in normalen Leberzellen gefundene starke Anstieg von Malat und Citrat sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien war in Biotinmangel-Hepatozyten nicht mehr festzustellen.

Bezüglich der Ketonkörperbildung aus Oleat bestand zwischen Biotinmangel-Hepatozyten und normalen Leberzellen kein Unterschied (Tabelle 31). Oleat führte nicht nur zu einer starken Mengenzunahme von 3-HOB und AcAc, sondern verschob auch das Verhältnis der beiden zugunsten von 3-HOB. Beim Vergleich der 3-HOB/AcAc-Quotienten in Tabelle 31 und Tabelle 23 ist zu berücksichtigen, daß sich die Versuchsbedingungen unterscheiden. Die Daten der Tabelle 31 wurden bei serumfreien Inkubationen der Hepatozyten ohne Vorinkubation gewonnen.

Tabelle 3o

WIRKUNG VON OLEAT AUF DIE SUBZELLULÄRE VERTEILUNG VON MALAT UND CITRAT IN HEPATOZYTEN AUS NORMALEN UND BIOTINMANGEL-RATTEN

Isolierte Leberzellen 24 h gehungelter normaler bzw. Biotinmangelratten wurden 10 min mit den angegebenen Substraten inkubiert. Die Pyruvatcarboxylaseaktivität der Biotinmangel-Hepatozyten betrug $0,63 \pm 0,16 \mu\text{Mol CO}_2$ fixiert/min pro g Frischgewicht ($n = 5$). Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM und in Klammern die Anzahl der Zellpräparationen angegeben. Die Daten der normalen Hepatozyten wurden der Diplomarbeit entnommen (58,84).

Diät	Substrat	Konz.	Metabolitgehalt (nMol/g TG)			
			Malat		Citrat	
			(mM) mitochondrial cytosolisch	mitochondrial cytosolisch		
Normal	Laktat	8	102	454	840	836
	Laktat plus Oleat	8 0,9	561	3547	1942	2883
Biotin- frei	Laktat	8	140+20 (4)	670+230 (4)	490+110 (3)	380+120 (3)
	Laktat plus Oleat	8 0,9	210+50 (5)	970+180 (5)	710+140 (5)	410+190 (5)

Tabelle 31

STIMULATION DER KETONKÖRPERBILDUNG DURCH OLEAT IN BIOTINMANGEL- UND NORMALEN HEPATOZYTEN
 Die Versuchsbedingungen sind in der Legende zu Tabelle 29 beschrieben.

Diät	Substrat	Konz.	Metabolitveränderung			
			{,uMol/g TG in 10 min}			3-HOB AcAc
		(mM)	3-Hydroxy- butyrat	Aceto- acetat	3-HOB +AcAc	
Normal	Laktat	8	2,9	17,1	20,0	0,17
	Laktat plus Oleat	8 0,9	40,9	42,1	83,0	0,97
Biotin- frei	Laktat	8	3,0±0,3 (5)	11,9±1,9 (5)	14,9	0,25
	Laktat plus Oleat	8 0,9	27,2±3,0 (5)	31,6±5,6 (5)	58,8	0,86

11. Vergleich der Wirkungen verschiedener Hormone auf Stoffwechselleistungen und Metabolitkompartimentierung isolierter Hepatozyten (85)

Die Glukosebildungsraten von Hepatozyten 48 Stunden gehungerter Tiere unter der Wirkung verschiedener Hormone sind in Tabelle 32 aufgeführt. Die Stimulierung der Glukosebildung durch 0,1 mM Dibutyryl-cyclo-AMP war gleich groß, wie die durch sättigende Konzentrationen (Abbildung 2) von Glucagon. Die Glukoneogenese wurde auch durch Adrenalin, Phenylephrin und Isoproterenol stimuliert, wenn auch weniger als durch Glucagon. Vasopressin stimulierte ebenfalls die Glukoneogenese in isolierten Leberzellen.

Im Gegensatz zur Glukoneogenese wurde die Ketogenese nur durch Glucagon gesteigert ($P < 0,005$). Die anderen Effektoren verursachten aber alle eine Verschiebung der mitochondrialen Pyridinnukleotide - angezeigt durch den 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten - zur reduzierten Seite hin (Tabelle 32).

Tabelle 33 faßt die Veränderungen der mitochondrialen Gehalte von Phosphoenolpyruvat, 2-Oxoglutarat, Glutamat, ATP, ADP und Pyruvat durch die verschiedenen Effektoren zusammen.

Phosphoenolpyruvat stieg unter allen Bedingungen in der mitochondrialen Matrix an, während 2-Oxoglutarat im gleichen Raum durch alle Effektoren gesenkt wurde. Der mitochondriale ADP-Gehalt stieg nach Inkubation mit allen

Tabelle 32

WIRKUNG VERSCHIEDENER HORMONE AUF GLUKONEOGENESE, KETOGENESE UND DEN REDOXZUSTAND DER MITOCHONDRIALEN PYRIDINNUKLEOTIDE IN ISOLIERTEN LEBERZELLEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN

Hepatozyten wurden in einer serumhaltigen Inkubationsmischung mit 8 mM Laktat als Substrat 30 min inkubiert. Dann wurden je 5 μ l von Stammlösungen zugegeben, sodaß sich Endkonzentrationen von von 7 μ g/ml Glucagon, 0,1 mM Dibutyryl-cyclo-AMP (Db-cyclo-AMP), 250 μ E/ml Vasopressin, 10 μ M Phenylephrin, 5 μ M Isoproterenol und 1 μ M Adrenalin ergaben. Die Kontrollen erhielten nur Lösungsmittel. Die Inkubation wurde dann für 10 min fortgesetzt. Es sind Mittelwerte $\pm$ SEM und in Klammern die Anzahl verschiedener Zellpräparationen angegeben.

^aP < 0,05 ^bP < 0,01 ^cP < 0,005

Effektor	Metabolitveränderung				
	{ μ Mol/g TG in 10 min }				
	Glukose	Aceto- acetat (A)	3-Hydroxy- butyrat (B)	A+B	B/A
1a) Kontrolle	59,5 $\pm$ 4,7 (15)	6,9 $\pm$ 0,9 (15)	2,5 $\pm$ 0,5 (15)	9,4	0,36
b) Glucagon	90,7 $\pm$ 5,6 ^c (15)	3,2 $\pm$ 0,5 ^c (15)	8,9 $\pm$ 0,4 (15)	12,1	2,78
2a) Kontrolle	47,2 $\pm$ 8,0 (6)	13,1 $\pm$ 1,1 (6)	4,3 $\pm$ 1,1 (6)	17,4	0,33
b) Db-cyclo-AMP	86,6 $\pm$ 3,5 ^b (6)	8,1 $\pm$ 2,1 ^a (6)	11,6 $\pm$ 2,7 ^b (6)	19,7	1,43
c) Adrenalin	68,6 $\pm$ 4,3 ^a (6)	5,9 $\pm$ 1,9 ^b (6)	15,2 $\pm$ 2,6 ^c (6)	21,1	2,58
3a) Kontrolle	54,3 $\pm$ 4,8 (12)	7,5 $\pm$ 0,9 (12)	2,0 $\pm$ 0,4 (12)	9,5	0,27
b) Vaso- pressin	74,6 $\pm$ 5,0 ^c (12)	4,4 $\pm$ 0,8 ^c (12)	5,6 $\pm$ 1,0 ^c (12)	10,0	1,27
c) Phenyl- ephrin	79,6 $\pm$ 10,5 ^b (12)	4,0 $\pm$ 0,9 ^c (12)	5,6 $\pm$ 0,9 ^c (12)	9,6	1,40
d) Isoprote- renol	72,4 $\pm$ 6,9 ^a (12)	6,2 $\pm$ 1,2 (12)	4,1 $\pm$ 0,9 ^c (12)	10,3	0,66

Tabelle 33

WIRKUNG VERSCHIEDENER HORMONE AUF DIE MITOCHONDRIALEN METABOLITGEHALTE ISOLIERTER LEBERZELLEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN

Die Leberzellen wurden wie in der Legende zu Tabelle 32 beschrieben mit 8 mM Laktat inkubiert und dann wie im Methodenteil beschrieben fraktioniert.

Effektor	Metabolitgehalt ($\mu\text{Mol/g TG}$)				
	Phosphoenol- pyruvat	2-Oxogluta- rat	Glutamat	ATP	ADP
1a) Kontrolle	0,34 $\pm$ 0,03 (15)	0,24 $\pm$ 0,07 (7)	3,36 $\pm$ 0,14 (5)	2,51 $\pm$ 0,16 (9)	1,46 $\pm$ 0,10 (7)
b) Glucagon	0,57 $\pm$ 0,05 ^c (15)	0,05 $\pm$ 0,02 ^a (7)	1,67 $\pm$ 0,15 ^c (5)	3,01 $\pm$ 0,36 ^a (9)	1,69 $\pm$ 0,10 ^c (7)
2a) Kontrolle	0,35 $\pm$ 0,03 (6)	0,43 $\pm$ 0,09 (6)	4,56 $\pm$ 0,42 (6)	2,18 $\pm$ 0,20 (6)	1,78 $\pm$ 0,14 (6)
b) Db-cyclo- AMP	0,74 $\pm$ 0,05 ^c (6)	0,17 $\pm$ 0,05 ^c (6)	2,32 $\pm$ 0,56 ^c (6)	2,19 $\pm$ 0,17 (6)	1,99 $\pm$ 0,16 ^a (6)
c) Adrenalin	0,66 $\pm$ 0,07 ^c (6)	0,11 $\pm$ 0,03 ^c (6)	1,62 $\pm$ 0,23 ^c (6)	2,59 $\pm$ 0,21 (6)	2,15 $\pm$ 0,14 ^c (6)
3a) Kontrolle	0,34 $\pm$ 0,03 (10)	0,30 $\pm$ 0,04 (7)	5,99 $\pm$ 0,72 (10)	2,20 $\pm$ 0,12 (11)	1,46 $\pm$ 0,07 (9)
b) Vaso- pressin	0,42 $\pm$ 0,03 ^a (10)	0,14 $\pm$ 0,05 ^c (7)	2,99 $\pm$ 0,30 ^c (10)	2,47 $\pm$ 0,16 ^a (11)	1,61 $\pm$ 0,07 ^a (9)
c) Phenyl- ephrin	0,48 $\pm$ 0,05 ^c (10)	0,12 $\pm$ 0,02 ^c (7)	2,68 $\pm$ 0,21 ^c (10)	2,52 $\pm$ 0,13 ^b (11)	1,63 $\pm$ 0,11 ^a (9)
d) Isoprote- renol	0,39 $\pm$ 0,03 ^a (10)	0,16 $\pm$ 0,04 ^a (7)	5,33 $\pm$ 0,60 (10)	2,33 $\pm$ 0,19 (11)	1,48 $\pm$ 0,07 (9)
					0,26 $\pm$ 0,05 (6)
					0,26 $\pm$ 0,06 (6)
					0,25 $\pm$ 0,03 (6)
					0,17 $\pm$ 0,02 (6)

Effektoren außer Isoproterenol an, der mitochondriale Glutamatspiegel dagegen wurde von den gleichen Effektoren gesenkt. Das mitochondriale ATP wurde nur von Glucagon, Vasopressin und Phenylephrin angehoben. Die Pyruvatspiegel blieben unter allen Bedingungen unverändert. Die Veränderungen der cytosolischen Metabolitgehalte nach Inkubation mit den verschiedenen Effektoren sind in Tabelle 34 zusammengefaßt. Alle bis auf Vasopressin führten zu einem Anstieg des cytosolischen Phosphoenolpyruvats. Die 2-Oxoglutarat- und Glutamatgehalte wurden von allen Effektoren außer Isoproterenol vermindert. Der cytosolische Gehalt an ATP fiel nach Glucagon und Adrenalin ab, wobei der ADP-Gehalt von Adrenalin erhöht wurde. Der Pyruvatgehalt blieb auch im Cytosol unter allen Bedingungen unverändert.

Tabelle 34

WIRKUNG VERSCHIEDENER HORMONE AUF DIE CYTOSOLISCHEN METABOLITGEHALTE ISOLIERTER LEBERZELLEN 48 STUNDEN GEHUNGERTER RATTEN

Experimentelle Details siehe Tabelle 32

Effektor	Metabolitgehalt (µmol/g TG)				
	Phosphoenol- pyruvat	2-Oxogluta- rat	Glutamat	ATP	ADP
1a) Kontrolle	0,44±0,04 (15)	1,16±0,16 (7)	11,16±0,89 (5)	8,31±0,65 (9)	1,50±0,20 (7)
b) Glucagon	0,77±0,08 ^c (15)	0,46±0,04 ^c (7)	6,13±0,81 ^c (5)	7,09±0,51 ^c (9)	1,38±0,07 (7)
2a) Kontrolle	0,44±0,05 (6)	1,88±0,17 (6)	19,13±2,83 (6)	7,69±0,96 (6)	1,52±0,23 (6)
b) Db-cyclo- AMP	0,81±0,11 ^a (6)	0,74±0,11 ^c (6)	9,56±1,84 ^c (6)	7,54±0,97 (6)	1,54±0,19 (6)
c) Adrenalin	0,67±0,04 ^c (6)	0,74±0,15 ^c (6)	7,09±1,47 ^c (6)	6,74±0,66 ^a (6)	1,69±0,19 ^a (6)
3a) Kontrolle	0,45±0,03 (10)	1,42±0,10 (7)	15,59±1,27 (10)	7,48±0,20 (11)	1,51±0,15 (9)
b) Vaso- pressin	0,50±0,05 (10)	0,94±0,08 ^c (7)	9,74±0,89 ^c (10)	7,12±0,25 (11)	1,55±0,08 (9)
c) Phenyl- ephrin	0,65±0,08 ^b (10)	0,94±0,10 ^c (7)	8,64±0,84 ^c (10)	7,31±0,31 (11)	1,34±0,14 (9)
d) Isoprote- renol	0,58±0,09 ^a (10)	1,52±0,21 (7)	14,35±1,02 (10)	7,35±0,16 (11)	1,16±0,10 (9)
					0,53±0,08 (6)
					0,57±0,08 (6)
					0,51±0,05 (6)
					0,59±0,07 (6)

DISKUSSION

Die Brauchbarkeit der in dieser Arbeit verwendeten isolierten Leberzellen für Studien zur Regulation des Leberstoffwechsels wird durch eine Reihe von Befunden dokumentiert. Dies geht zunächst einmal aus der Tatsache hervor, daß die Metabolitgehalte unserer Hepatozyten gut mit denen vergleichbar waren, die für Lebergewebe in situ bzw. nach Perfusion ermittelt wurden. Dies gilt auch für Oxalacetat, für welches Tischler et al. (86) in ihren Hepatozyten wesentlich höhere Spiegel angeben. Ferner bildeten unsere Hepatozyten Glukose und Ketonkörper mit ähnlicher Geschwindigkeit wie die perfundierte Leber (Tabelle 3). Die Harnstoffbildung hingegen lag unter unseren Inkubationsbedingungen um etwa 400% über den Perfusionswerten. Schließlich waren unsere Leberzellen hormonell stimulierbar, wobei insbesondere das Ausmaß der Glucagonwirkung auf Glukoneogenese, Harnstoffsynthese und Ketogenese den Perfusionsergebnissen entsprach (Tabelle 11).

Die in dieser Arbeit verwendeten Hepatozyten erfüllen somit alle Kriterien, die H.A. Krebs für intakte Hepatozyten gefordert hat (87).

Validität der Digitonin Methode

Aus elektronenmikroskopischen Studien (88) sowie aus der Verteilung cytosolischer und mitochondrialer Enzyme geht hervor, daß unter den Standardbedingungen der Digitonin-

methode (4 mg/ml, 30 sec Inkubation) nur die Plasmamembran zerstört wird, ohne daß die innere Mitochondrienmembran angegriffen wird. Damit ist zwar gezeigt, daß eine gute Trennung von Cytosol und Mitochondrien erreicht wird, doch können bei der Fraktionierung weitere Probleme auftreten, a) durch die Verschleppung cytosolischer Bestandteile in die mitochondriale Fraktion, und b) durch das Weiterlaufen von Transportvorgängen und Enzymreaktionen während der Zellfraktionierung. Da diese Möglichkeiten zu einer Verfälschung des in vivo Zustandes der subzellulären Metabolitverteilung führen, ist die Kenntnis ihres Ausmaßes von entscheidender Bedeutung. Was die Adeninnukleotide betrifft, so haben Siess und Wieland (88) und Akerboom et al. (89) gezeigt, daß die Verschleppung aus der cytosolischen Fraktion maximal 5% des mitochondrialen Adeninnukleotidgehalts ausmachen kann. Die Verschleppung von Citrat, Oxalacetat und Acetyl-CoA kann maximal 2% des mitochondrialen Gehalts betragen (Tabelle 4). Somit darf man annehmen, daß es bei der Zentrifugation durch Silikonöl zu keiner merkwürdigen Verschleppung cytosolischer Bestandteile in die Mitochondrienfraktion kommt.

Tischler et al. (45) beobachteten bei ihrer Fraktionierungsmethode ohne Anwendung von Digitonin nicht unerhebliche Veränderungen der mitochondrialen Metabolite, wenn nicht Hemmstoffe des Metabolittransportes zum Medium zugesetzt wurden. Wie Tabelle 5 zeigt, ergeben sich bei der Digitoninmethode mit Ausnahme von Malat dieselben mito-

chonrialen Metabolitgehalte, gleich ob man die Fraktionierung in An- oder Abwesenheit von Transportinhibitoren durchführte. Ähnliche Evidenz gegen merkliche Umverteilung von Metaboliten während der Fraktionierung erbrachten Experimente von Zuurendonk und Tager (90). Diese Autoren konnten alles Malat, das dem Digitoninmedium zugesetzt wurde, im Überstand wiederfinden. Auch hatte der Zusatz von Glutamat zum Digitoninmedium keinen Einfluß auf die mitochondrialen Glutamat- und Aspartatspiegel (91).

Bezüglich der Fixierung des metabolischen Zustands konnten Siess und Wieland zeigen, daß eine Verlängerung der Digitoninexposition von 20 auf 40 sec keinen Einfluß auf die mitochondrialen ATP- und ADP-Spiegel hatte (57). Eben- sowenig beeinflusste eine Erhöhung der Temperatur auf bis zu 6°C die ATP- und ADP-Spiegel in der Niederschlagsfraktion (88).

Bei ihrer Methode der Fraktionierung perfundierter Lebern in nichtwässrigen Medien haben Soboll et al. (92-94) erheblich niedrigere mitochondriale ATP/ADP-Quotienten gefunden, als andere Autoren nach Fraktionierung mit der Digitoninmethode (43,88,95,96), (siehe auch Tabelle 13). Zur Erklärung dieser Diskrepanz wurde von Soboll et al. (94) vermutet, daß es während der Fraktionierung mit Digitonin noch zu einer partiellen Aufphosphorylierung von mitochondrialem ADP kommt, ein Vorgang, der beim Gefrierstopppverfahren vermieden wird: Falls diese Vermutung zutrifft, so

sollte sich der ATP/ADP-Quotient sofort mit Perchlorsäure gestoppter Hepatozyten von dem ATP/ADP-Quotienten, gebildet aus den Summen der cytosolischen und mitochondrialen Adennukleotide nach Digitoninfraktionierung, unterscheiden. Die Daten aus Tabelle 6 zeigen jedoch, daß die Quotienten praktisch von gleicher Höhe waren, jedenfalls was die Inkubation der Zellen ohne Substrat bzw. mit Adenosin betrifft. Der aus der Summe Cytosol plus Mitochondrien erhaltene ATP/ADP-Quotient war leicht erhöht, wenn der Adennukleotidgehalt der Hepatozyten durch Inkubation mit hohen Fruktosekonzentrationen stark gesenkt worden war. Falls dieser Unterschied auf eine artefizielle Phosphorylierung des mitochondrialen ADP zurückgehen sollte, so würde sie rechnerisch etwa 20% betragen. Eine nachträgliche Aufphosphorylierung mitochondrialen ADPs während der Fraktionierung wird besonders durch die Ergebnisse der Tabelle 7 unwahrscheinlich gemacht. In diesen Experimenten wurde gezeigt, daß die mitochondrialen ADP-Gehalte nahezu unbeeinflußt von einer Temperaturerniedrigung um 10°C waren, während die ATP-Gehalte eher etwas höher lagen.

Die Tabellen 35 und 36 zeigen einen Vergleich der in dieser Arbeit bestimmten subzellulären Verteilung verschiedener Metabolite mit den Ergebnissen, die mit anderen Methoden erhalten wurden. Vergleicht man die Ergebnisse der Digitoninmethode mit den Ergebnissen, die mit der Scherkräftmethode an Hepatozyten gehungerter Ratten erhalten

Tabelle 35

CYTOSOLISCHE (cyt.) UND MITOCHONDRIALE (mit.) METABOLITKONZENTRATIONEN SOWIE KONZENTRATIONSGRADIENTEN (m/c) IN DER LEBER GEHUNGERTER RATTEN, WIE SIE NACH VERSCHIEDENEN METHODEN ERHALTEN WURDEN

Metabolit	Metabolitindikator-Methode		Scherkraft-Methode		Nichtwässr. Leberextraktion		Diese Arbeit	
	Williamson et al. (9)	Parilla et al. (36)	Tischler et al. (36)	Soboll (93)	Tabellen 12 und 13			
	cyt. mit. m/c	cyt. mit. m/c	cyt. mit. m/c	cyt. mit. m/c	cyt. mit. m/c	cyt. mit. m/c		
Acetyl-CoA	0,063 0,25 4,0	-	0,1 ^b 0,13 ^b 1,3 ^b	<0,003 ^a 0,94 ^a >313 ^a	0,057 0,61 10,7			
CoA	0,104 1,89 18	-	0,13 ^b 0,48 ^b 3,7 ^b	0,008 ^a 0,70 ^a 87,5 ^a	0,073 3,08 42,2			
Glutamat	6,11 6,11 1,0 ⁺	3,98 0,90 0,23	1,47 ^b 6,23 ^b 4,2 ^b	6,5 8,7 1,34	7,66 15,52 2,03			
Malat	0,26 0,38 1,46	0,47 0,37 0,79	0,27 ^b 1,54 ^b 5,7 ^b	0,80 1,80 2,30	0,58 1,33 2,29			
Aspartat	0,80 0,80 1,0 ⁺	0,80 0,14 0,18	2,84 ^b 9,28 ^b 3,3 ^b	1,7 0,71 0,42	0,99 0,66 0,67			
2-Oxoglutarat	0,24 8,43 35	0,75 0,01 0,01	0,43 ^b 3,08 ^b 7,2 ^b	0,45 1,3 2,9	1,23 3,2 2,6			
Citrat	0,14 12,89 92,07	0,74 1,60 2,16	0,95 ^b 8,57 ^b 9,0 ^b	1,0 3,2 3,2	0,58 6,28 10,83			
Zugegebene Substrate	8-12 mM Laktat	10 mM Laktat	5 mM Laktat 0,5 mM Pyruvat 0,3 mM 3-Hydroxybutyrat 0,3 mM Acetoacetat	2 mM Laktat	11,9 mM Laktat			
Untersuchungsmaterial	perfundierte Leber	perfundierte Leber	isolierte Leberzellen	perfundierte Leber	isolierte Leberzellen			

^a Einzelexperimente

^b Mittelwert von zwei Experimenten

⁺ Gleichmäßige Verteilung wurde angenommen

CYTOSOLISCHE (cyt.) UND MITOCHONDRIALE (mit.) METABOLITKONZENTRATIONEN SOWIE KONZENTRATIONSGRADIENTEN (m/c) IN DER LEBER GEFÜTTERTER RATEN, WIE SIE NACH VERSCHIEDENEN METHODEN ERHALTEN WURDEN

Metabolit	Metabolitindikator-Methode		Scherkraft-Methode		Nichtwässr. Leberextraktion		Diese Arbeit	
	cyt.	mit. m/c	Tischler et al. (86)		Soboll (93)		Tabelle 37	
	cyt.	mit. m/c	cyt. mit. m/c	cyt. mit. m/c	cyt. mit. m/c	cyt. mit. m/c	cyt. mit. m/c	cyt. mit. m/c
Acetyl-CoA	-	-	0,12 ^b 0,55 ^b 4,51 ^b	0,005 ^a 0,24 ^a 48 ^a	0,005 ^a 0,38 ^a 76 ^a	0,01 0,63 6,30	0,11 1,02 9,1	
CoA	-	-	0,09 ^b 0,46 ^b 5,0 ^b	0,005 ^a 0,38 ^a 76 ^a	0,005 ^a 0,38 ^a 76 ^a	0,05 2,19 44	- 1,75 -	
Glutamat	4,28-4,69	0,21-4,29	1,63 ^b 8,41 ^b 5,1 ^b	4,80 1,70 0,35	4,80 1,70 0,35	7,76 12,9 1,66	8,55 17,2 2,02	
Malat	0,47-0,72	0,72-3,21	0,45 ^b 1,46 ^b 3,2 ^b	0,47 0,50 1,10	0,47 0,50 1,10	1,22 1,23 1,00	0,90 1,23 1,35	
Aspartat	1,24-1,36	0,05-1,25	3,66 ^b 15,9 ^b 4,3 ^b	1,20 0,35 0,29	1,20 0,35 0,29	14,4 5,95 0,41	7,75 3,94 0,51	
2-Oxoglutarat	0,21-0,22	0,01-0,13	0,42 ^b 2,57 ^b 6,1 ^b	0,31 0,53 1,70	0,31 0,53 1,70	0,74 1,23 1,68	0,74 1,31 1,79	
Citrat	0,43-0,45	1,90-2,33	0,57 ^b 8,57 ^b 15,4 ^b	0,35 1,70 5,00	0,35 1,70 5,00	0,86 5,78 6,72	1,24 8,75 7,10	
Zugegebene Substrate	-	-	5 mM Laktat 0,5 mM Pyruvat 0,3 mM 3-Hydroxybutyrat 0,3 mM Acetoacetat	5 mM Glukose 2 mM Laktat 0,2 mM Pyruvat	5 mM Glukose 2 mM Laktat 0,2 mM Pyruvat	10 mM Laktat	10 mM Pyruvat	
Unter-suchungs-material	Leber in situ		isolierte Leberzellen	perfundierte Leber	isolierte Leberzellen			

^a Einzelexperimente

^b Mittelwert von zwei Experimenten

wurden, zeigen sich Unterschiede bezüglich der subzellulären Verteilung von Aspartat, Coenzym A und Acetyl-CoA und, was in Tabelle 35 nicht gezeigt ist, bezüglich der Verteilung von Oxalacetat. Tischler et al. (86) haben im Vergleich zur Literatur wesentlich überhöhte Oxalacetatspiegel berichtet. Die Ergebnisse der Digitoninmethode sind aber gut vergleichbar mit denen, die mit der nichtwässrigen Extraktionsmethode erhalten wurden. Die Daten, die mit der Metabolitindikatormethode (41,65,97,98) erhalten wurden, variieren in sich stark, je nachdem welche Prämissen für die Berechnung benutzt wurden.

In Tabelle 36 sind die Ergebnisse der verschiedenen Methoden für den gefütterten Zustand verglichen. Auch hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung der mit der Digitoninmethode gewonnenen Daten mit denen nach nichtwässriger Fraktionierung erhaltenen (Ausnahme Glutamat und eventuell Acetyl-CoA).

Metabolitkonzentrationen in Mitochondrien und Cytosol isolierter Hepatozyten gefütterter Ratten

In Tabelle 37 sind die Metabolitkonzentrationen in Mitochondrien und Cytosol, berechnet aus den Daten der Tabellen 8 und 9, aufgeführt. Wie man aus den Daten der Tabelle 37 ersehen kann, wurde der Konzentrationsgradient zwischen Mitochondrien und Cytosol kaum durch die verschiedenen Substrate beeinflusst. Auch zeigten die Hepatozyten gefütterter Ratten nahezu die gleiche Metabolitverteilung

Tabelle 37

METABOLITKONZENTRATIONEN IN MITOCHONDRIEN (m) UND CYTOSOL (c) ISOLIERTER LEBERZELLEN GEFÜTTERTER RATTEN UNTER VERSCHIEDENEN SUBSTRATBEDINGUNGEN

Methodische Details siehe Tabellen 8 und 9.

Substrat	Konz. CoASH		AcCoA		Citrat		Malat		Oxalacetat		Aspartat		Glutamat		2-Oxogluta-	
	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(μ M)	(μ M)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
-	-	2,0	0,1	0,76	0,086	4,38	0,45	0,35	0,41	14,7	15,5	-	-	-	-	-
Laktat	10	2,19	0,05	0,63	0,096	5,78	0,86	1,23	1,22	16,2	20,2	5,95	14,36	12,87	7,76	1,23
Pyruvat	7	1,75	-	1,02	0,112	8,75	1,24	1,23	0,90	25,8	47,1	3,94	7,75	17,24	8,55	1,31
Alanin	7	2,1	-	0,75	0,107	2,54	0,18	0,09	0,35	7,2	20,1	7,53	17,09	26,69	11,91	0,12
Oleat	0,9	1,49	0,03	1,36	0,054	6,30	0,87	1,05	1,58	18,8	40,6	-	-	-	-	-
Oleat + Laktat	10	1,4	0,04	1,08	0,048	10,24	1,84	4,46	3,01	24,4	50,6	-	-	-	-	-
Ethanol	12	1,93	-	1,12	0,082	3,68	0,33	1,49	1,13	7,8	4,2	2,80	5,76	16,89	5,47	0,61
Aspartat	7	1,75	-	0,76	0,074	-	-	-	-	62,3	25,1	-	-	-	-	-

wie Hepatozyten gehungerter Ratten (58,84), obwohl die absoluten Konzentrationen unterschiedlich waren. Die Veränderungen der Acetyl-CoA-, Citrat- und Malatkonzentrationen, wie sie sich nach Inkubation mit verschiedenen Substraten ergeben, sind auf Grund folgender Überlegungen zu verstehen. Die Erhöhung des mitochondrialen Acetyl-CoA nach Pyruvat dürfte das Ergebnis eines Anstiegs des Anteils der aktiven Form der Pyruvatdehydrogenase (PDH_a) sein. Daß die PDH_a nach Pyruvat ansteigt, wurde sowohl an der isoliert perfundierten Leber (99) als auch an isolierten Leberzellen (88) und isolierten Mitochondrien (100) gezeigt. Der Anstieg der mitochondrialen Malat-, Citrat- und Oxalacetatkonzentration nach Inkubation der Hepatozyten mit Pyruvat, Oleat bzw. Oleat plus Laktat könnte die Folge einer Aktivierung der Pyruvatcarboxylase durch Acetyl-CoA sein, das von 0,76 auf 1 bzw. auf 1,36 mM anstieg. Dem scheint zunächst die niedrigere Aktivierungskonstante K_a der Pyruvatcarboxylase aus Rattenleber für Acetyl-CoA von 20 μM (101-103) entgegenzustehen. Neuere Untersuchungen mit intakten Rattenlebermitochondrien haben jedoch apparente K_a -Werte von etwa 0,25 mM (104) und 0,32 mM (105) ergeben. Zudem wurde gezeigt (88), daß nach Oleatgabe das mitochondriale ATP/ADP-Verhältnis ansteigt, was die Pyruvatcarboxylase zusätzlich aktivieren könnte (106). In Übereinstimmung mit der Ansicht, daß die mitochondriale Acetyl-CoA-Konzentration von regulatorischer Bedeutung für die Pyruvatcarboxylase ist, steht auch der Be-

fund, daß die Erhöhung der mitochondrialen Acetyl-CoA-Konzentration nach Ethanolgabe von einer vielfachen Erhöhung der Malatkonzentration begleitet war (Tabelle 37). Die Citratkonzentration blieb vermutlich auf Grund der erniedrigten Oxalacetatkonzentration unverändert. In Bezug auf die Veränderungen der Citrat- und 2-Oxoglutaratkonzentrationen durch Alanin beobachteten Sies et al. (95) ähnliche Effekte nach Inkubation der Hepatozyten mit 10 mM NH_4^+ .

Es sei hervorgehoben, daß die Veränderungen der Acetyl-CoA-Konzentrationen in Mitochondrien und Cytosol durch Oleat bzw. Oleat plus Laktat einander entgegengesetzt waren und bei Bestimmung der Gesamtzellgehalte nicht bemerkt worden wären.

Die Daten in Tabelle 37 ermöglichen auch eine Beurteilung der Versorgung von Metabolittransportern und von Schlüsselenzymen des Citratcyclus und der Lipogenese mit Substraten und Effektoren.

Unter allen Substratbedingungen waren die Konzentrationen von Citrat, Malat, 2-Oxoglutarat und Glutamat bis zu einer Größenordnung höher, als die apparenten Michaelis-Konstanten von $0,12 - 0,22 \text{ mM}$ (107,108), $0,23 \text{ mM}$ (109), $0,05 \text{ mM}$ (110) bzw. $0,6 - 5 \text{ mM}$ (111-113), die für die entsprechenden mitochondrialen Transporter berichtet wurden. Nach Studien mit isolierten Mitochondrien wird die 2-Oxoglutarataufnahme durch Malat, Citrat, Aspartat und Glutamat gehemmt. Die K_i -Werte betragen $0,12 \text{ mM}$, $3,6 \text{ mM}$, $2,7 \text{ mM}$ bzw. $2,5 \text{ mM}$ (110). Außerdem wurde gezeigt, daß Malat den Citrat-

einstrom in Mitochondrien hemmt ($K_i = 0,7 \text{ mM}$) (107). Nach den Daten der Tabelle 37 wären die cytosolischen Malatkonzentrationen in der Leberzelle hoch genug, um den Transport von 2-Oxoglutarat zu behindern. Andererseits würden sie aber nicht ausreichen, um den Citrattransport effektiv zu beeinträchtigen. Die cytosolische Konzentration von Citrat lag immer weit unter dem K_i -Wert für den 2-Oxoglutarat Transporter, sodaß eine Regulation desselben durch Citrat in intakten Leberzellen unwahrscheinlich erscheint. Hingegen waren die Aspartat- und Glutamatkonzentrationen im Cytosol hoch genug (Tabelle 37), um eine Wechselwirkung mit dem 2-Oxoglutarat Transporter zu ermöglichen. Was den Metabolittransport aus den Mitochondrien ins Cytosol anlangt, so ist es von Interesse, daß die mitochondrialen Konzentrationen von Malat und 2-Oxoglutarat maximal eine Halbsättigung der betreffenden Transporter erreichen können, deren Dissoziationskonstanten zu $1,5 \text{ mM}$ bzw. $3,6 \text{ mM}$ bestimmt wurden (114).

Bezüglich der kinetischen und regulatorischen Eigenschaften der Pyruvatdehydrogenase ist festzustellen, daß der K_m -Wert für CoASH von $5 \mu\text{M}$ und der K_i -Wert für Acetyl-CoA von $1 \mu\text{M}$, bestimmt am isolierten Rattenleberenzym (115), weit unter den mitochondrialen Konzentrationen dieser Metabolite (Tabelle 37) liegen.

Untersuchungen an isolierter Pyruvatdehydrogenase aus Schweineleber haben gezeigt, daß die PDH_a Kinaseaktivität eine Funktion des Acetyl-CoA/CoASH- und des $\text{NADH}/\text{NAD}^{+}$ -

Quotienten ist (116). Wenn das Rattenleberenzym - was an-
zunehmen ist - durch die gleichen Mechanismen reguliert
wird, so liegen die in dieser Arbeit bestimmten mitochon-
drialen Acetyl-CoA/CoASH- und NADH/NAD⁺-Quotienten von
0,3 - 0,9 bzw. 0,02 - 0,06 (berechnet für pH 7,0) in einem
Bereich, der die Aktivität der PDH_a Kinase sehr wohl be-
einflussen könnte.

In Bezug auf die Kontrolle der Fettsäurebiosynthese zeigt
Tabelle 37, daß die cytosolische Acetyl-CoA-Konzentration
im Bereich der K_m (36 µM bei 1 mM Citrat) (118) von ge-
reinigter Rattenleber-Acetyl-CoA-Carboxylase liegt. Die
cytosolischen Konzentrationen von Citrat, eines Aktiva-
tors dieses Enzyms (Übersicht 117), liegen zwischen de-
nen, die für eine 50%ige Aktivierung der α- und β-Formen
der Acetyl-CoA-Carboxylase mit 0,2 mM bzw. 2,4 mM bestimmt
wurden (119).

pH-Differenz über die Mitochondrienmembran

Aus Versuchen mit isolierten Mitochondrien ist gefolgert
worden, daß die Anionenverteilung über die Mitochondrien-
innenmembran mit der pH-Differenz über diese Membran kor-
reliert (120). Es wurde folgende Beziehung zwischen ΔpH
und Anionenverteilung gefunden (120):

$$\Delta \text{pH} = \text{pH}_m - \text{pH}_c = \frac{1}{n} \left\{ \log \left[\frac{A_c}{A_{m \max}} + \frac{A_m}{A_c} \right] - \log F \right\} \quad (1)$$

wobei pH_m=Matrix pH, pH_c=Cytosol pH, n=Anionenladung, A_c=
Cytosolkonzentration von A, A_m=Matrixkonzentration von A,

$A_m^{\max}$ = maximal erreichbare Matrixkonzentration von A, F = Verhältnis der Aktivitätskoeffizienten von A im Cytosol und in den Mitochondrien. Im Idealfall ($F = 1$, $A_c \ll A_m^{\max}$) vereinfacht sich diese Beziehung zu

$$\Delta pH = \frac{1}{n} \log \frac{A_m}{A_c} \quad (2)$$

Mit dieser Gleichung kann man die pH-Differenz über die Mitochondrieninnenmembran bei Kenntnis des Konzentrationsgradienten eines Anions über diese Membran berechnen.

Tabelle 38

pH-DIFFERENZ ÜBER DIE INNERE MITOCHONDRIENMEMBRAN IN ISOLIERTEN LEBERZELLEN GEFÜTTERTER RATTEN

Die pH-Differenz ($\Delta pH = pH_m - pH_c$) wurde aus der Anionen (A^{n-}) - Verteilung zwischen cytosolischem und mitochondrialem Kompartiment nach der Formel

$$\Delta pH = \frac{1}{n} \log \frac{A_m}{A_c} \quad (120)$$

unter Verwendung der Daten von Tabelle 37 berechnet.

Zugegebenes Substrat	(mM)	ΔpH berechnet aus der Verteilung von			
		Citrat	Glutamat	2-Oxoglutarat	Malat
-		0,33	-	-	-0,034
Laktat	10	0,28	0,22	0,11	0,002
Oleat	0,9	0,29	-	-	-0,09
Laktat plus Oleat	10 0,9	0,25	-	-	0,085
Pyruvat	7	0,28	0,30	0,12	0,068
Alanin	7	0,38	0,36	0,12	-0,29
Ethanol	12	0,35	0,48	0,05	0,06

Tabelle 38 und 39 zeigen die Ergebnisse solcher Berechnungen mit den Konzentrationsgradienten, die in dieser Arbeit in Hepatozyten gefütterter und gehungerter Ratten gemessen wurden. Wie man sieht, war die pH-Differenz, ausgerechnet aus dem Citrat-Gradienten m/c unabhängig vom Substratangebot an die Hepatozyten und vom Ernährungszustand der Donorratten und etwa gleich groß wie das ΔpH berechnet aus der Glutamat- und (mit Einschränkungen) der Pyruvatverteilung. Diese Werte stimmen recht gut mit denen überein, die an isolierten Mitochondrien gefunden wurden (121). Die pH-Differenzen, die aus der 2-Oxoglutaratverteilung berechnet wurden, lagen eindeutig niedriger, während die Werte, berechnet aus der Malatverteilung abhängig vom Substrat und vom Ernährungszustand der Donorratten, stark schwankten.

Es liegt deshalb die Annahme nahe, daß sich nur diejenigen Anionen entsprechend dem ΔpH und der Gleichung (2) über die Mitochondrieninnenmembran verteilen, deren Transport mit einem Cotransport von H^+ (Citrat) (122) oder einem Gegentausch von OH^- (Glutamat) (112), Pyruvat (124,125) verbunden ist. Hingegen scheint die für den Malat- und 2-Oxoglutarataustausch geforderte Kopplung mit dem Phosphat-Transporter (126) in der intakten Leberzelle nicht gegeben zu sein.

Die Daten der Tabelle 39 decken sich nicht mit den von Tischler et al. (45) mit der Scherkraftmethode erhaltenen Ergebnissen. Diese Autoren errechnen aus den Konzen-

Tabelle 39

pH-DIFFERENZEN ÜBER DIE INNERE MITOCHONDRIENMEMBRAN IN ISOLIERTEN LEBERZELLEN GEHUNGERTER RATTEN

Die pH-Differenzen wurden wie in der Legende zu Tabelle 38 angegeben berechnet.

Bedingung	Daten aus Tabelle	Citrat	Δ pH berechnet aus der Verteilung von		
			Glutamat	2-Oxoglutarat	Malat
ohne Substrat	(Lit. 58)	0,36	-	-	0,52
Laktat	(Lit. 58)	0,31	-	-	0,14
Oleat	(Lit. 58)	-	-	-	0,55
Laktat + Oleat	(Lit. 58)	0,25	-	-	0,06
Pyruvat	(Lit. 58)	0,32	-	-	0,16
Ethanol	(Lit. 58)	0,48	-	-	0,45
Laktat	14	0,34	0,30	0,21	0,18
Laktat + Glucagon	14	0,38	0,14	0,17	0,10
Laktat	26	0,37	0,32	0,17	0,06
Laktat + Oleat	26	0,33	0,40	0,13	0,09
Laktat	18	0,34	0,42	0,02	0,10
Laktat + cyclo-AMP	18	0,48	0,44	0,04	0,04
Laktat	32 + 33	-	0,30	0,14	-
Laktat + db-cyclo-AMP	32 + 33	-	0,30	0,14	-
Laktat + Adrenalin	32 + 33	-	0,28	0,04	-
Laktat	32 + 33	-	0,40	0,12	-
Laktat + Glucagon	32 + 33	-	0,36	-0,02	-
Laktat	32 + 33	-	0,50	0,06	-
Laktat + Vasopressin	32 + 33	-	0,40	0,05	-
Laktat + Phenylephrin	32 + 33	-	0,42	0,01	-
Laktat + Isoproterenol	32 + 33	-	0,50	-0,03	-
					0,38

trationsgradienten von Malat und 2-Oxoglutarat über die Mitochondrieninnenmembran eine pH-Differenz der gleichen Größenordnung wie aus den Gradienten von Citrat, Pyruvat und Glutamat (45).

Regulation der Ketonkörperbildung

Die Beobachtung, daß ATP die Aktivität isolierter Citratsynthase hemmt, gab zu der Vorstellung Anlaß, daß diese Hemmung in vivo eine Rolle für die Regulation der Ketogenese spielen könnte (2). Dieses Konzept wird durch die vorliegenden Daten über die Kompartimentierung des Citrates (Tabelle 8) - in Verbindung mit früheren Ergebnissen von Siess und Wieland (88) über die ATP-Verteilung - nicht gestützt. Nur nach Inkubation mit Pyruvat wurde eine inverse Beziehung von mitochondrialem ATP und Citrat gefunden, hingegen nicht nach Inkubation mit Oleat oder Ethanol. Auch wurden im Hunger und Streptozotocin-Diabetes normale mitochondriale ATP-Spiegel gefunden (88), was schwerlich mit dem Konzept der Stimulation der Ketonkörperbildungsrate über eine Hemmung der Citratsynthase durch ATP zu vereinbaren ist. In diesem Zusammenhang sind auch kürzlich publizierte Befunde von Matlib et al. (127) von Interesse, wonach die Citratsynthaseaktivität isolierter Mitochondrien zwar nach Extraktion mit Hilfe von Ultraschall durch ATP hemmbar war, aber nicht, wenn die Enzymaktivität "in situ", d.h. in toluolpermeabilisierten Mitochondrien gemessen wurde.

Auch Malat und 2-Oxoglutarat, die isolierte Citratsynthese kompetitiv zu Oxalacetat hemmen (128), scheinen in intakten Leberzellen keine regulatorische Rolle zu spielen, da die K_i -Werte von 16 mM bzw. 10 mM (128) weit über den von uns ermittelten mitochondrialen Konzentrationen dieser Metabolite von jeweils etwa 1,2 mM (Tabelle 37) liegen.

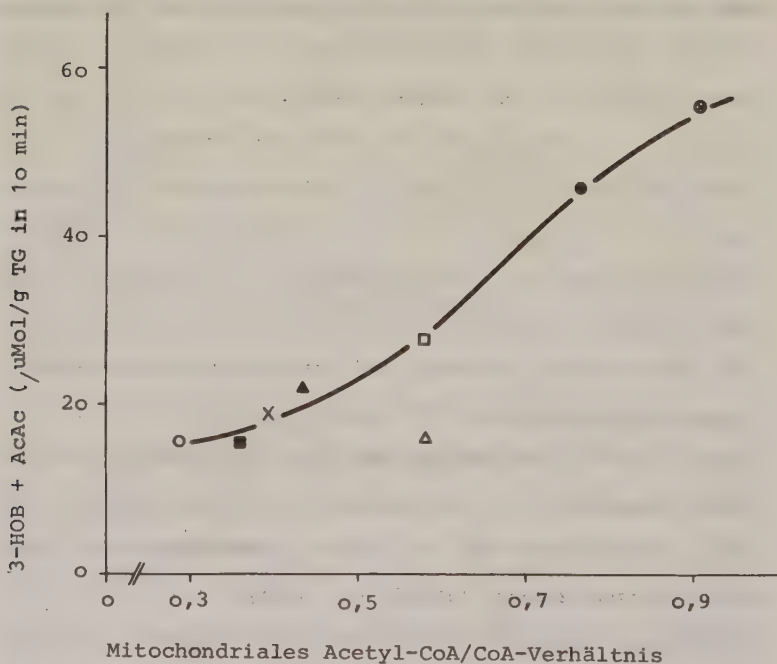


Abb. 12 KETONKÖRPERBILDUNG VON HEPATOZYTEN GEFÜTTERTER RATTEN ALS FUNKTION DES MITOCHONDRIALEN ACETYL-COA/COA-VERHÄLTNISSSES

- (○) 10 mM Laktat, (■) 7 mM Alanin, (x) endogenes Substrat, (▲) 7 mM Aspartat, (Δ) 12 mM Ethanol, (□) 7 mM Pyruvat, (●) 10 mM Laktat plus 0,9 mM Oleat, (⊙) 0,9 mM Oleat

Nach Studien mit isolierten Lebermitochondrien ist die Ketonkörperbildungsrate weniger eine Funktion der Acetyl-CoA-Konzentration, als vielmehr des Verhältnisses Acetyl-CoA/CoA (129,130). Die Gültigkeit dieser Beziehung für Mitochondrien in isolierten Hepatozyten konnte in der Diplomarbeit (58,84) für den Hungerzustand nachgewiesen werden. Abbildung 12 zeigt, daß auch im Futterzustand eine Beziehung zwischen dem mitochondrialen Acetyl-CoA/CoA-Verhältnis und der Ketonkörperbildungsrate besteht.

In der Diskussion zur Regulation der Ketonkörperbildung nimmt das Oxalacetat eine zentrale Stellung ein (131,132, Übersicht 133). Mit der in der Diplomarbeit ausgearbeiteten Isotopenmethode ließ sich der früher beobachtete Abfall des Leber-Oxalacetatspiegels nach Hunger (54) bestätigen (von $4,4 \pm 0,3$ nMol/g Frischgewicht auf $2,6 \pm 0,5$ nMol/g Frischgewicht (53)). Die Bestimmungsmethode erlaubte darüber hinaus, die sehr niedrigen Oxalacetatspiegel in den Zellkompartimenten zu erfassen. Dabei wurden je nach Substrat mitochondriale Oxalacetatkonzentrationen von $8-27 \mu\text{M}$ (Tabelle 37) ermittelt.

Bei einer geschätzten Konzentration der Oxalacetat-Bindungsstellen aller in Frage kommenden Matrixenzyme von etwa $200 \mu\text{M}$ (134) ist deshalb anzunehmen, daß nur ein geringer Teil des Oxalacetats in ungebundener Form vorliegt und für die Citratsynthase verfügbar ist. Es wurde deshalb versucht, die Konzentration an freiem Oxalacetat rechnerisch zu ermitteln. Dazu wurden die Quotienten der Reak-

tanten der Citratsynthase, der mitochondrialen Aspartataminotransferase und der mitochondrialen Malatdehydrogenase berechnet und mit den Gleichgewichtskonstanten dieser Enzyme verglichen. Wie Tabelle 4o zeigt, ist der Quotient der Reaktanten der Citratsynthase um drei Größenordnungen kleiner als die Gleichgewichtskonstante, d.h. die Reaktanten der Citratsynthase in intakten Hepatozyten sind weit vom Gleichgewicht entfernt. Würde das Enzym, wie es für die Berechnung der subzellulären Verteilung von Acetyl-CoA und CoASH vorgeschlagen wurde (137), tatsächlich das Gleichgewicht einstellen, so würde daraus eine freie mitochondriale Oxalacetatkonzentration von nur etwa 1 nM resultieren, eine Größe, die sehr unwahrscheinlich erscheint.

Der Quotient der Reaktanten der Aspartataminotransferase war unter allen Substratbedingungen (außer Alanin) höher als die Gleichgewichtskonstante. Unter der Annahme der Gleichgewichtseinstellung durch das Enzym würden in diesem Falle die errechneten freien Oxalacetatkonzentrationen den totalen mitochondrialen Oxalacetatgehalt um das 2 bis 8fache übersteigen, wenn Laktat, Pyruvat oder Ethanol als Substrat zugegen sind.

Tabelle 4o zeigt schließlich, daß die Quotienten der Reaktanten der Malatdehydrogenase 8-26fach höher sind als die Gleichgewichtskonstante dieses Enzyms. Hierbei wird vorausgesetzt, daß das 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Verhältnis das mitochondriale NADH/NAD^+ -Verhältnis am Ort der

Tabelle 4o

QUOTIENTEN DER REAKTANTEN DER CITRATSYNTHASE, DER MITOCHONDRIALEN ASPARTATAMINOTRANSFERASE UND DER MITOCHONDRIALEN MALATDEHYDROGENASE

Die mitochondrialen Metabolitkonzentrationen aus Tabelle 37 wurden zur Berechnung der Quotienten benutzt. Die NADH/NAD^+ -Quotienten für die Berechnung des Quotienten der Malatdehydrogenase wurden aus der Gleichgewichtskonstanten der 3-Hydroxybutyratdehydrogenase (65) und den 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten aus Tabelle 1o berechnet.

$$A = \frac{[\text{Citrat}] \times [\text{CoASH}]}{[\text{Oxalacetat}] \times [\text{Acetyl-CoA}]}$$

$$B = \frac{[2\text{-Oxoglutarat}] \times [\text{Aspartat}]}{[\text{Glutamat}] \times [\text{Oxalacetat}]}$$

$$C = \frac{[\text{Oxalacetat}] \times [3\text{-Hydroxybutyrat}]}{[\text{Malat}] \times [\text{Acetoacetat}]} \times 4,93 \times 10^{-2}$$

Substrat	Konz. (mM)	Quotienten der Reaktanten der		
		Citrat- synthase A	Aspartatamino- transferase B	Malat- dehydrogenase C
-	-	784	-	$8,4 \times 10^{-4}$
Laktat	1o	124o	35,1	$3,0 \times 10^{-4}$
Pyruvat	7	582	11,6	$5,2 \times 10^{-4}$
Alanin	7	988	4,7	$7,5 \times 10^{-4}$
Oleat	o,9	367	-	$6,6 \times 10^{-4}$
Oleat plus Laktat	o,9 1o	544	-	$3,1 \times 10^{-4}$
Ethanol	12	813	13,o	$2,3 \times 10^{-4}$
Gleichge- wichtskon- stante		$0,46 \times 10^6$ $2,24 \times 10^6$	6,6	$2,78 \times 10^{-5}$
Literatur		(135,136)	(51)	(65)

Malatdehydrogenase wiedergibt. Wenn dies der Fall ist, und wenn die Malatdehydrogenase das Gleichgewicht zwischen ihren Reaktanten einstellt, so lassen sich je nach Substrat freie mitochondriale Oxalacetatkonzentrationen von $0,3 - 2,2 \mu\text{M}$ berechnen (Tabelle 41).

Die mitochondriale Acetyl-CoAkonzentration war unter allen Substratbedingungen etwa 45 mal größer als der K_m -Wert der Citratsynthase von $8,5 - 16 \mu\text{M}$ (2,128,138), wie er für das isolierte Enzym aus Rattenleber bestimmt wurde. Die Acetyl-CoAkonzentration lag auch etwa 10 mal über dem apparenten K_m -Wert der Citratsynthase von $77 \mu\text{M}$, wie er an isolierten Rattenlebermitochondrien in situ bestimmt wurde (127). Es ist daher anzunehmen, daß die Citratsynthase in Bezug auf Acetyl-CoA in der intakten Leberzelle unter Sättigungsbedingungen arbeitet. Bei einem K_m -Wert der Citratsynthase für Oxalacetat von $2 - 7 \mu\text{M}$ (2,127,128,139,140) und den berechneten freien Oxalacetatkonzentrationen von $0,3 - 2,2 \mu\text{M}$ (Tabelle 41) sollte die Aktivität des Enzyms und damit die Citratbildung mit steigenden Konzentrationen an freiem Oxalacetat zunehmen. In Abbildung 13 wurden die gemessenen mitochondrialen Citratkonzentrationen (Tabelle 37) gegen die berechneten freien mitochondrialen Oxalacetatkonzentrationen aufgetragen. Den Erwartungen entsprechend ergibt sich eine hyperbolische Sättigungskurve, aus der man eine apparente K_m der Citratsynthase für Oxalacetat von $2 \mu\text{M}$ ermitteln kann (Abbildung 13 Inset). Mit Ethanol und Laktat als Substrat fügt sich die

Tabelle 41

FREIE MITOCHONDRIALE OXALACETATKONZENTRATIONEN IN DER MITOCHONDRIALEN MATRIX ISOLIERTER HEPATOZYTEN GEFÜTTERTER RATTEN

Die freien Oxalacetatkonzentrationen wurden aus der Gleichgewichtskonstanten der Malatdehydrogenase (65), der mitochondrialen Malatkonzentration (Tabelle 37) und dem mitochondrialen NADH/NAD^+ -Verhältnis berechnet. Das NADH/NAD^+ -Verhältnis wurde aus der Gleichgewichtskonstanten der 3-Hydroxybutyratdehydrogenase (65) und dem 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten (Tabelle 10) berechnet.

$$[\text{Oxalacetat}] = [\text{Malat}] \times \frac{[\text{Acetoacetat}]}{[\text{3-Hydroxybutyrat}]} \times 5,64 \times 10^{-4}$$

Substrat	Konz. (mM)	Mitochondriale "freie" Oxalacetatkonzentration (μM)
-	-	0,47
Laktat	10	1,51
Pyruvat	7	1,39
Alanin	7	0,26
Oleat	0,9	0,79
Oleat plus Laktat	0,9 10	2,19
Ethanol	12	0,95

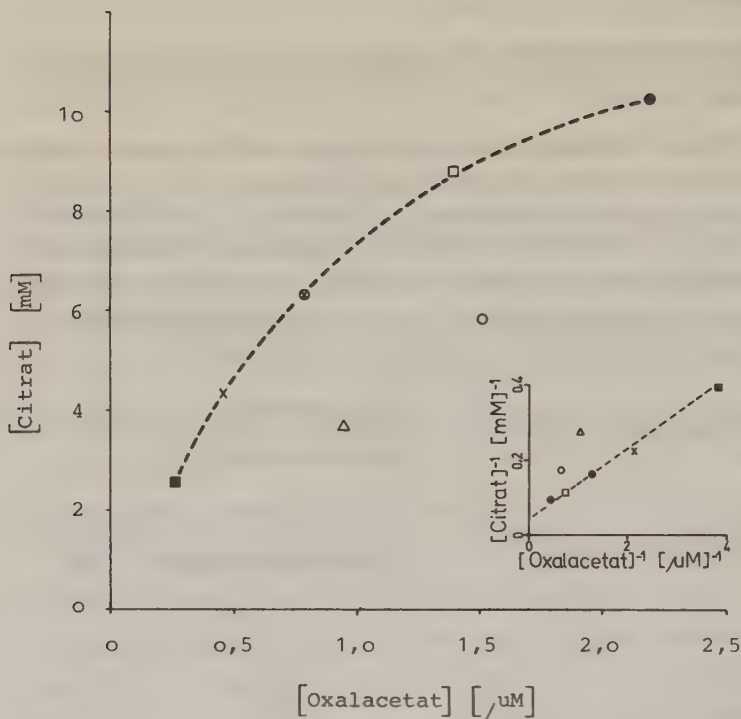


Abb. 13 ABHÄNGIGKEIT DER MITOCHONDRIALEN CITRATKONZENTRATION VON DER BERECHNETEN FREIEN MITOCHONDRIALEN OXALACETATKONZENTRATION

Die Symbole sind die gleichen wie in der Legende zu Abbildung 12 angegeben. Das Inset zeigt eine doppeltrittproke Auftragung der gleichen Daten.

mitochondriale Citratkonzentration allerdings nicht in die Sättigungskurve ein. Möglicherweise gilt die Voraussetzung, daß sich die Reaktanten der Malatdehydrogenase und der 3-Hydroxybutyratdehydrogenase im Gleichgewicht befinden, nicht mehr, wenn die Hepatozyten mit Substraten inkubiert werden,

die große Mengen an NADH im Cytosol bilden.

Dennoch läßt Abbildung 13 vermuten, daß die Aktivität der Citratsynthase in intakten Leberzellen durch den Spiegel des freien Oxalacetats reguliert wird. Aus Daten über den Q_{O_2} der Leber und der V_{max} der Citratsynthase, wie sie von Srere (128) angegeben wurden, wäre eine Konzentration des freien Matrixoxalacetats von $0,6 \mu M$ nötig, um die Aktivität des Enzyms in der Leber zu erklären. Wie Tabelle 41 zeigt, stimmt dieser Wert gut mit den freien Oxalacetatkonzentrationen überein, die aus den mitochondrialen Reaktanten der Malatdehydrogenase bei Inkubation der Hepatozyten mit endogenem Substrat oder mit Fettsäuren berechnet wurden. Diese Ergebnisse können somit als guter Hinweis dafür gewertet werden, daß in der intakten Leberzelle die Verfügbarkeit des freien Oxalacetats eine wichtige Regelgröße der Citratsynthaseaktivität darstellt.

Glucagoneffekt auf die subzelluläre Metabolitverteilung

Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen es erstmals zu differenzieren, in welchem Zellkompartiment und in welchem Ausmaß Glucagon die Konzentration von Metaboliten verändert. So wurden die cytosolischen und mitochondrialen ATP-Konzentrationen in entgegengesetzter Richtung verändert, ein Effekt des Glucagons, der bei Messung des Gesamt-ATP-Spiegels der Zellen nicht zutage tritt. Weiterhin stellte sich heraus, daß der Anstieg des zellulären Acetyl-CoA durch Glucagon ausschließlich auf eine Zu-

nahme im mitochondrialen Kompartiment zurückging. Die glucagonbedingten Bewegungen von 2-Oxoglutarat, Glutamat und Phosphoenolpyruvat betrafen etwa in gleichem Ausmaß den mitochondrialen und cytosolischen Raum. Bisher nicht bekannt war auch die Tatsache, daß 40% des gesamten Phosphoenolpyruvats der Rattenleber mitochondrial lokalisiert sind. Die intramitochondriale Lokalisation wurde durch Versuche abgesichert, in denen dem Fraktionierungsmedium Mg^{2+} , ADP und Pyruvatkinase in Mengen zugesetzt wurde, die ausreichten, um selbst einen Überschuß Phosphoenolpyruvat in der fraglichen Zeit komplett umzusetzen. Dabei blieb der Phosphoenolpyruvatgehalt der Niederschlagsfraktion unverändert, woraus zu folgern ist, daß sich dieser Teil des zellulären Phosphoenolpyruvats innerhalb der mitochondrialen Membranen befand und deshalb der Pyruvatkinase nicht zugänglich war.

Zum Mechanismus der Glucagonwirkung Unterschiede zur Wirkung von Fettsäuren

Die Steigerung der Ketonkörperbildung in vivo und in vitro durch Glucagon ist allgemein bekannt. So fanden Bewsher und Ashmore (141), daß Leberschnitte aus glucagonvorbehandelten Ratten eine erhöhte Ketonkörperbildungsrate aufwiesen. Ähnliche Ergebnisse erzielten McGarry et al. (67), wenn sie Ratten mit Glucagon vorbehandelten und anschließend die Lebern perfundierten. Diese Ergebnisse werden durch die Experimente von Abbildung 4 bestätigt und auf

isolierte Hepatozyten ausgedehnt. Aus der Tatsache, daß Glucagon in vitro in der perfundierten Leber die Ketonkörperbildung parallel zur Glukosebildung stimuliert (61, 80, 142, 143), wurde ursprünglich gefolgert, daß Glucagon die Erhöhung der Glukoneogeneserate über eine verbesserte Fettsäureversorgung bewirkt (61, 62, 74, 79, 80, 142). Erste Zweifel an dieser Vorstellung kamen auf durch Arbeiten von Ross et al. (81) und Exton et al. (82), in denen gezeigt wurde, daß sich die Effekte von Glucagon und Fettsäuren auf die Glukoneogenese additiv verhalten. Außerdem konnten Fröhlich und Wieland zeigen, daß Glucagon auch dann die Glukoneogenese stimulierte, wenn die Lipolyse durch Glycodiazin gehemmt war (83).

Die Additivität der Glucagon- und Oleateffekte wurde hier noch einmal bestätigt (Tabelle 27). Darüber hinaus gestatten die vorliegenden Befunde aber eine noch weitergehende Differenzierung der Wirkung des Glucagons und langkettiger Fettsäuren.

1. Glucagon stimuliert die Glukoneogenese aus Glutamin, nicht aber Oleat (Tabelle 29).

2. Glucagon erhöht die Bildung von 3-Hydroxybutyrat und senkt die Acetoacetatbildung (Tabellen 11, 27, 32). Im Gegensatz dazu steigert Oleat in der perfundierten Leber und in isolierten Leberzellen (58, 77, 84, 142) sowohl die Acetoacetat- als auch die 3-Hydroxybutyratbildung (Tabellen 10, 25, 27).

3. Oleat, nicht aber Glucagon führt zu einer Erhöhung der cytosolischen und mitochondrialen Konzentrationen von Malat und Citrat (Tabelle 26).

4. Oleat führt zu einer Anhebung des mitochondrialen Glutamatspiegels (Tabelle 26), während dieser von Glucagon gesenkt wird.

5. Zur Differenzierung tragen auch die Ergebnisse der Tabelle 28 bei, die zeigen, daß die Effekte von Glucagon auf gesamtzelluläre Metabolitgehalte auch in Anwesenheit von Oleat zu beobachten sind.

Mit diesen Beobachtungen wird die Ansicht (81-83) bestätigt, daß die Glucagonwirkung nicht durch eine vermehrte Freisetzung von Fettsäuren erfolgen kann.

Zum Mechanismus der Oleatwirkung

Die Veränderungen der zellulären Spiegel von Malat, Citrat, Glutamat, 2-Oxoglutarat, Phosphoenolpyruvat (Tabelle 26) und Acetyl-CoA (Tabellen 8 und 9) in isolierten Hepatozyten stehen in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die an der perfundierten Leber gewonnen wurden (75,144, 145). Es liegt nahe zu vermuten, daß die Erhöhung der Malat- und Citratspiegel in Mitochondrien und Cytosol auf eine Aktivierung der Pyruvatcarboxylase durch Acetyl-CoA zurückzuführen ist, da diese Effekte in Biotinmangel-Hepatozyten praktisch nicht mehr zu beobachten waren (Tabelle 30). Der Stimulierung der Glukoneogenese aus Laktat durch Oleat (Tabelle 25) dürfte die gleiche Aktivierung

der Pyruvatcarboxylase zu Grunde liegen, da die Glukoneogenese aus Glutamin (Tabelle 29), die die Pyruvatcarboxylase nicht benötigt, durch Oleat nicht stimuliert wurde.

Es wird heute allgemein angenommen (146,147), daß der Glucagoneffekt auf die Glukoneogenese über cyclo-AMP vermittelt wird. Damit steht im Einklang, daß die Effekte von Glucagon und cyclo-AMP auf die Glukoneogenese nicht additiv sind (Tabelle 21). Ähnliche Ergebnisse erhielten Tolbert und Fain mit Dibutyryl-cyclo-AMP (148).

Ort(e) der Glucagonwirkung Mitochondriale Wirkungen

Ausgehend von der Beobachtung, daß der Pyruvattransport in Mitochondrien aus Lebern glucagonbehandelter Ratten stimuliert ist (4,5,7,147), lag die Annahme nahe, daß sich Pyruvat in der mitochondrialen Matrix unter Glucagon anhäuft und dadurch eine substratbedingte Aktivierung der Pyruvatcarboxylase zustandekommt. Die vorliegenden Messungen des Pyruvatgehalts in der Mitochondrienfraktion sprechen gegen diese Möglichkeit, da unter Glucagon keine Veränderung im Pyruvatgehalt festzustellen war. Demnach scheinen sich Pyruvataufnahme und -verbrauch die Waage zu halten. Für den Verbrauch kommt praktisch nur die Pyruvatcarboxylase in Frage, da sich die Aktivität des Pyruvatdehydrogenasekomplexes unter Glucagon nicht ändert (59). Nachdem die gefundenen mitochondrialen Pyruvatkonzentrationen über dem K_m -Wert der Pyruvatcarboxylase (103,

150,151) liegen, könnte eine Aktivierung der Pyruvatcarboxylase nur durch eine Erhöhung der $V_{\max}$ erreicht werden.

Bekannte Aktivatoren der Pyruvatcarboxylase sind Acetyl-CoA (102-105,151) und ein hoher ATP/ADP-Quotient (104, 106). Wie in dieser Arbeit gezeigt, sind beide Parameter nach Glucagon in der mitochondrialen Matrix signifikant, wenn auch nicht sonderlich stark, erhöht. Der Effekt des Acetyl-CoA könnte durch den Anstieg des Matrix pH nach Glucagon (149,152,153) potenziert werden (151,154,155). Eine Aktivierung der Pyruvatcarboxylase wäre weiterhin zu erwarten, wenn die Hemmung, der sie in intakten Mitochondrien unterliegt (156,157), gelockert würde. Nach Scrutton und White (158) hemmt Glutamat gereinigte Pyruvatcarboxylase aus Rattenleber bei einer Konzentration von 5 mM zu etwa 50%. Demnach sollte die in den Mitochondrien gemessene Glutamatkonzentration von normalerweise 15 mM das Enzym effektiv hemmen, als Erklärung dafür, warum die Pyruvatcarboxylase in Mitochondrienextrakten beträchtlich aktiver ist als in intakten Mitochondrien (156, 157). Demnach erscheint es auch durchaus vorstellbar, daß das Absinken der mitochondrialen Glutamatkonzentration durch Glucagon von 15 mM auf 3 mM mit einer Aktivierung der Pyruvatcarboxylase einhergeht.

Wenn also eine Aktivierung der Pyruvatcarboxylase anzunehmen ist, so erhebt sich als nächstes die Frage, warum das Reaktionsprodukt, Oxalacetat, nicht in den Mitochon-

drien akkumuliert (Tabelle 13). Es dürfte zu Malat und Aspartat umgesetzt werden, welche ins Cytosol transportiert werden und dort akkumulieren, entsprechend dem zuerst von Lardy vorgeschlagenen Konzept (159). Dies würde bedeuten, daß unter Glucagon weder die Umsetzung von Oxalacetat zu Malat und Aspartat, noch deren Transport ins Cytosol geschwindigkeitslimitierend sind.

Zu den auffälligsten Veränderungen nach Glucagon zählt der starke Abfall von 2-Oxoglutarat und Glutamat. Anscheinend fließen diese vermehrt in Aspartat und Malat und verlassen in dieser Form die Mitochondrien schneller als sie nachgebildet werden können. Der "Cross-over" zwischen Citrat und 2-Oxoglutarat läßt vermuten, daß die 2-Oxoglutaratdehydrogenase unter Glucagon mit erhöhter Geschwindigkeit arbeitet. Diese Vermutung deckt sich mit Ergebnissen von Siess und Wieland (160), die zeigen konnten, daß die Decarboxylierungsrate von 2-Oxoglutarat in Leber-Mitochondrien aus glucagonbehandelten Tieren gegenüber Mitochondrien aus Kontrollratten um den Faktor 1,6 beschleunigt war. An dieser Stelle ergibt sich auch eine Beziehung zu der Akkumulierung von Phosphoenolpyruvat in den Mitochondrien nach Glucagon (Tabelle 13), da eine Mehrbildung von GTP aus der Succinyl-CoA abhängigen Substratphosphorylierung möglicherweise zu einer Aktivierung der mitochondrialen Phosphoenolpyruvatcarboxykinase führen könnte. Der mitochondrialen Phosphoenolpyruvatcarboxykinase in der Rattenleber wurde bisher wenig Beachtung geschenkt, da

das Enzym bei dieser Spezies vorwiegend im Cytosol lokalisiert ist (161). Unsere Beobachtung über die erhöhte mitochondriale Phosphoenolpyruvatkonzentration würde eine Rolle dieses Enzyms in der Glukoneogenese auch in der Ratte vermuten lassen. Die Aktivität des aus Rattenlebermitochondrien extrahierten Enzyms beträgt nach Usatenko (162) und Saggerson und Evans (163) $0,19$ bzw. $0,1$ $\mu\text{Mol}/\text{min pro g Frischgewicht bei } 30^{\circ}\text{C}$ und wäre groß genug, um den Phosphoenolpyruvatanstieg unter Glucagon zu erklären. Es ist freilich nicht auszuschließen, daß auch ein cytosolisch-mitochondrialer Phosphoenolpyruvataustausch stattfindet.

Extramitochondriale Wirkungen des Glucagons

Die Anhäufung von Phosphoenolpyruvat im Cytosol wirft die Frage auf, ob Glucagon über eine Aktivierung der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase oder eine Hemmung der Pyruvatkinase oder über beide wirkt.

In isolierten Rattenleberzellen führt Glucagon durch Enzymphosphorylierung (164-166) zu einer Erhöhung der K_m der Pyruvatkinase für Phosphoenolpyruvat um einen Faktor von etwa 2 (18,19,22,23,25,27) ohne Veränderung der V_{max} . Daraus wurde gefolgert, daß die Pyruvatkinase unter Glucagonkontrolle steht (18-20,29). Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß der Anstieg des cytosolischen Phosphoenolpyruvats auf das Doppelte (Tabelle 12) die Erniedrigung der Substrataffinität der Pyruvatkinase kompensieren

und somit die Aktivität des Enzyms unverändert lassen könnte. Dies um so mehr, als von Feliú et al. (26) und Pilkis et al. (28) gezeigt wurde, daß die Hemmung der Pyruvatkinase nach Glucagon durch Phosphoenolpyruvat gemindert wird. Schließlich zeigten Rognstad und Katz (21), daß in Hepatozyten gehungerter Ratten der Flux durch die Pyruvatkinase nach Glucagon unverändert war. Die Bedeutung der Pyruvatkinsasphosphorylierung für die Regulation der Glukoneogenese durch Glucagon erscheint bisher noch unsicher.

Das Konzept der Regulation der Glukoneogenese durch Glucagon auf der Stufe der Phosphofruktokinase und/oder Fruktose-1,6-bisphosphatase (15,16) durch Veränderungen der cytosolischen Effektoren Citrat, ATP und AMP (Übersicht 167) wird durch die Kompartimentierungsversuche nicht gestützt. Die cytosolischen Citrat- und ATP-Konzentrationen fielen eher ab, anstatt wie postuliert anzusteigen, und die AMP-Konzentration blieb unverändert (Tabelle 12). Aus dem beobachteten Anstieg des cytosolischen 3-Phosphoglycerats ergibt sich eine andere Möglichkeit, das Überwiegen der Fruktose-1,6-bisphosphatase über die Phosphofruktokinase zu erklären. So wurde beschrieben (168, 169), daß 3-Phosphoglycerat oder Oleat die Fruktose-1,6-bisphosphatase aus Kaninchenleber vor der Hemmung durch ATP und ADP schützen. Außerdem wurde gezeigt (170), daß die Phosphofruktokinase in Gegenwart von Oleat und 3-Phosphoglycerat durch Wechselwirkung mit der Fruktose-1,6-bisphosphatase gehemmt wird. Aus diesen Daten könnte man spe-

kulieren, daß Glucagon durch Stimulierung der Lipolyse(61,80, 141-143,171,172)und der 3-Phosphoglyceratbildung (9,36,diese Arbeit) die Phosphofruktokinase in isolierten Leberzellen inaktivieren könnte. Die freien Fettsäuren wurden in dieser Arbeit nicht bestimmt, allerdings ist es bemerkenswert, daß der zelluläre Gehalt von langkettigem Acyl-CoA nach Glucagon in Hepatozyten ansteigt (59). Ein Überwiegen der Spaltungsreaktion im System Phosphofruktokinase-Fruktose-1,6-bisphosphatase würde, wie auch immer, den 50%igen Abfall des Fruktose-1,6-bisphosphats in der perfundierten Leber (9,16,33) erklären. Hierdurch wäre ein anderer Mechanismus für eine Hemmung der Pyruvatkinase gegeben, deren Funktion bei den vorliegenden cytosolischen ATP- und Phosphoenolpyruvatkonzentrationen von 4 bzw. 0,5 mM weitgehend von allosterischer Aktivierung durch Fruktose-1,6-bisphosphat abhängen dürfte (173-175).

Die Tatsache, daß in Biotinmangel-Zellen (Abbildung 8 und 9) wie in normalen Hepatozyten (73,176,Abbildung 7) oder perfundierten Lebern (32,72) die Glukoneogenese aus Dihydroxyaceton und Fruktose durch Glucagon stimuliert wird, legt die Vermutung nahe, daß Glucagon zusätzlich zu den Wirkungen auf mitochondrialer Ebene die Glukoneogenese auch durch cytosolische Wirkungen beeinflusst.

Einfluß von Glucagon auf den Redoxstatus der cytosolischen und mitochondrialen Pyridinnukleotide

Die Methode der Zellfraktionierung mit Digitonin ermöglichte eine experimentelle Überprüfung der gängigen An-

nahme (177,178), daß sich die Reaktanten der Laktatdehydrogenase und der Malatdehydrogenase im Lebercytosol im Gleichgewicht befinden. Tabelle 42 zeigt, daß tatsächlich nahezu gleiche cytosolische NAD^+/NADH -Quotienten errechnet werden, gleich ob man die gemessenen cytosolischen Konzentrationsverhältnisse von $[\text{Laktat}]/[\text{Pyruvat}]$ oder von $[\text{Malat}]/[\text{Oxalacetat}]$ (Tabelle 11) zugrundelegt. Das Gleiche gilt für Hepatozyten unter Glucagonstimulierung, wobei zu bemerken ist, daß hier die NAD^+/NADH -Quotienten beträchtlich niedriger liegen (Tabelle 42). Die NAD^+/NADH -Quotienten in Abwesenheit von Glucagon stimmen gut mit den Werten überein, die Williamson (97) für Rattenleber bei Perfusion mit Laktat angegeben hat. Auch der Wert des cytosolischen $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -Verhältnisses, berechnet aus den cytosolischen Pyruvat- und Malatkonzentrationen (Tabelle 12) und einer CO_2 -Konzentration von 1,16 mM (179) deckt sich gut mit Leberperfusionsergebnissen (97) und steht mit der von Krebs und Veech geäußerten Vermutung im Einklang, daß sich die Reaktanten des "Malic Enzyme" im Gleichgewicht befinden (179).

Die Berechnung der Redoxverhältnisse in den Mitochondrien aus den Reaktanten der 3-Hydroxybutyratdehydrogenase und der Glutamatdehydrogenase bestätigt, daß das mitochondriale NAD^+/NADH um ein Vielfaches niedriger liegt (176) und durch Glucagon weit stärker gesenkt wird als im Cytosol. Nach Berechnung aus dem mitochondrialen Malatdehydrogenase-System würde es noch einen zweiten Pyridinnukleo-

Tabelle 42

GLUCAGONWIRKUNG AUF DEN REDOXZUSTAND DES CYTOSOLISCHEN UND MITOCHONDRIALEN NAD- UND NADP-SYSTEMS IN ISOLIERTEN HEPATOZYTEN

Die Redoxverhältnisse wurden folgendermaßen berechnet:

- a) $\text{NAD}^+/\text{NADH} = [\text{Pyruvat}] / [\text{Laktat}] \times 1/K_{\text{LDH}}$, berechnet mit dem $[\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}]$ -Verhältnis von Tabelle 11 und $K_{\text{LDH}} = 1,11 \times 10^{-4}$ (65)
- b) $\text{NAD}^+/\text{NADH} = [\text{Oxalacetat}] / [\text{Malat}] \times 1/K_{\text{MDH}}$, berechnet mit den cytosolischen Oxalacetat- und Malatkonzentrationen der Tabelle 12 und $K_{\text{MDH}} = 2,78 \times 10^{-5}$ (65)
- c) $\text{NADP}^+/\text{NADPH} = [\text{Pyruvat}] \times [\text{CO}_2] / [\text{Malat}] \times 1/K_{\text{Malic Enzyme}}$, berechnet mit den cytosolischen Pyruvat- und Malatkonzentrationen von Tabelle 12, einer CO_2 -Konz. von 1,16 mM (179) und $K_{\text{Malic Enzyme}} = 3,44 \times 10^{-2}$ M (179)
- d) berechnet wie b mit den mitochondrialen Konzentrationen (Tabelle 13)
- e) $\text{NAD}^+/\text{NADH} = [\text{Acetoacetat}] / [3\text{-Hydroxybutyrat}] \times 1/K_{3\text{-HOBBDH}}$, berechnet mit den 3-HOB/AcAc-Quotienten von Tabelle 11 und $K_{3\text{-HOBBDH}} = 4,93 \times 10^{-2}$ (65)
- f) $\text{NAD}^+/\text{NADH} = [2\text{-Oxoglutarat}] \times [\text{NH}_4] / [\text{Glutamat}] \times 1/K_{\text{GluDH}}$, berechnet mit den Daten von Tabelle 13 und $[\text{NH}_4] = 1$ mM (65,180) und $K_{\text{GluDH}} = 3,87 \times 10^{-6}$ M (65)

Komparti- ment	Redoxstatus der freien Nikotinamid- dinukleotide	Redoxstatus berechnet aus den Reaktanten der Enzyme	Redox- verhältnis	
			Kon- trolle	Glu- tagon
Cytosol	NAD^+/NADH	Laktatdehydrogenase ^a	806	530
	NAD^+/NADH	Malatdehydrogenase ^b	769	568
	$\text{NADP}^+/\text{NADPH}$	"Malic Enzyme" ^c	0,038	0,014
Mitochon- drien	NAD^+/NADH	Malatdehydrogenase ^d	757	572
	NAD^+/NADH	3-HOB-Dehydrogenase ^e	67	10
	NAD^+/NADH	Glutamatdehydrogenase ^f	52	-

tidpool geben, dessen Redoxstatus in gleicher Höhe wie im Cytosol liegt. Die Bedeutung dieses Befundes ist schwer zu beurteilen, da die Berechnung davon ausgeht, daß das gesamte mitochondriale Oxalacetat an der Einstellung des Malatdehydrogenase-Gleichgewichtes teilnimmt. Wie bereits besprochen (siehe Seite 87) ist dies allerdings wenig wahrscheinlich.

Dosis-Wirkungsbeziehungen

Die Dosisabhängigkeit der Stimulation von Ketogenese und Glukoneogenese sowie des Abfalls von 2-Oxoglutarat und Glutamat (Abbildung 2) zeigt, daß Ketogenese und Glukoneogenese in Hepatozyten gehungerter Ratten gleich sensitiv auf Glucagon reagieren. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Exton et al. (181), die an der perfundierten Leber gefütterter Ratten eine unterschiedliche Hormonempfindlichkeit von zwei Größenordnungen fanden. Die Tatsache, daß der Abfall von 2-Oxoglutarat und Glutamat in gleicher Weise von der Glucagonkonzentration abhing wie die Stimulierung von Ketogenese und Glukoneogenese, zeigt, daß das Hormon nicht bevorzugt auf einen der genannten Stoffwechselprozesse einwirkt. Dies betrifft schließlich auch die Veränderung des Redoxstatus der mitochondrialen Pyridinnukleotide (65), angezeigt am 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Verhältnis, die die gleiche Glucagonabhängigkeit zeigt (Abbildung 3).

Experimente mit Biotinmangel-Hepatozyten

In Bezug auf die Experimente mit Biotinmangel-Hepatozyten ist vorweg zu sagen, daß von den glukoneogenetischen Enzymen nur die Pyruvatcarboxylase im Biotinmangel betroffen ist (70). Dies wird auch durch die Ergebnisse über die Glukosebildung aus Glutamin bestätigt. Die Glukoneogenese aus diesem Substrat, das die Pyruvatcarboxylase nicht benötigt, ist im Biotinmangel unverändert und durch Glucagon stimulierbar. Auch die Absenkung der C_5 -Dicarboxylate und die Stimulierung der Ketogenese durch Glucagon sind in Biotinmangel-Hepatozyten noch nachweisbar. Man kann daraus schließen, daß diese Effekte des Glucagons nicht sekundär zur Stimulation der Glukoneogenese erfolgen.

Wirkungen anderer Hormone auf die Metabolitkompartimentierung in Leberzellen

Die Befunde zur Stimulation der Glukosebildung isolierter Hepatozyten aus Laktat durch Vasopressin entsprechen denen an der perfundierten Leber (182) und wurden kürzlich bestätigt (183,184). Die Aktivierung der Laktatglukoneogenese durch Dibutyryl-cyclo-AMP stimmt überein mit Ergebnissen von Garrison und Haynes (185), Tolbert et al. (148), von Brylla et al. (186) mit Glutamin als Substrat und von Pilkis et al. (187) mit Hepatozyten gefütterter Ratten. In diesen Zellen wurde wie in Zellen gehungerter Tiere die Glukoneogenese durch Adrenalin, Phenylephrin

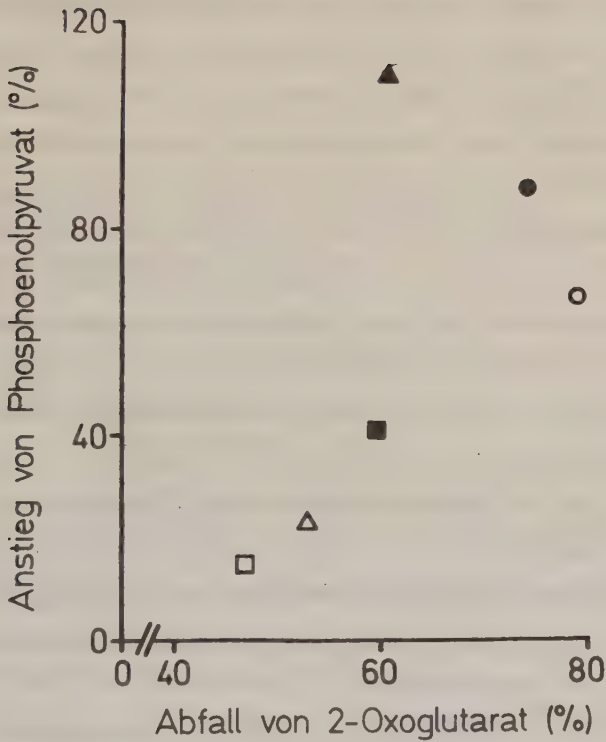


Abb. 14 BEZIEHUNG ZWISCHEN DEM ABFALL VON 2-OXOGLUTARAT UND DEM ANSTIEG VON PHOSPHOENOLPYRUVAT IM MITOCHONDRIALEN KOMPARTIMENT ISOLIERTER LEBERZELLEN NACH HORMONSTIMULATION

Die Inkubationsbedingungen sind in der Legende zu Tabelle 31 beschrieben.

(○) Glucagon, (●) Adrenalin, (▲) Dibutyryl-cyclo-AMP, (△) Vasopressin, (□) Phenylephrin, (◻) Isoproterenol,

oder Isoproterenol weniger stark stimuliert als mit Dibutyryl-cyclo-AMP (187-190). Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen fanden Tolbert et al. (191) unter ihren Bedingungen keine Stimulation der Glukoneogenese durch Isoproterenol.

Bei den Versuchen mit Dibutyryl-cyclo-AMP fiel auf, daß es nicht - wie im Falle des Glucagons - zu einem Anstieg des mitochondrialen ATP kam (Tabelle 33). Dagegen wurde ein solcher Anstieg von Bryla (186) auch nach Db-cyclo-AMP beobachtet. Auffallend und den verschiedenen Hormonen gemeinsam war eine Senkung des mitochondrialen 2-Oxoglutarats bei gleichzeitigem Anstieg des Phosphoenolpyruvats. Abbildung 14 zeigt, daß zwischen diesen beiden Veränderungen eine Beziehung besteht. Dies und die Tatsache, daß alle Hormone sich gleichartig auch auf den Redoxstatus der mitochondrialen Pyridinnukleotide auswirkten (Tabelle 32), läßt vermuten, daß die verschiedenen Signale an einem gemeinsamen mitochondrialen Wirkungsort zusammenlaufen.

EXPERIMENTELLER TEIL

M a t e r i a l i e n

1. Geräte

Sorvall-Kühlzentrifuge "Superspeed RC 2-B
Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Connecticut USA

Standzentrifuge Hettich-Rotixa
Fa. Hettich, D 7200 Tübingen

Standzentrifuge Typ UJ 3
Fa. Christ, D 3360 Osterode/Harz

Eppendorf Zentrifuge 3200
" " Thermostat 3401
" " Rotationsmischer 3300
" " Photometer 1101 M mit
Küvettenwechselausw. 2705 und
Kompensationsschreiber 6511
Fa. Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz, D 2000 Hamburg

Schüttelwasserbad
Gesellschaft für Labortechnik mbH&Co., D 3000 Hannover

Phasenkontrastmikroskop "Orthoplan"
Ernst Leitz GmbH, D 6300 Lahn-Wetzlar

Waage Mettler P160
Analysenwaage Typ H 15
Fa. Spoerhase AG, D 6300 Lahn-Gießen

Perfusionskammer, Eigenbau

Rollpumpe Favorit 5000
Fa. Deuster, D 8000 München

pH-Meter, Fa. L. Püsl, D 8000 München

Two Wavelength Double Beam Spectrophotometer Typ 356
Perkin Elmer Bodenseewerk, D 7770 Überlingen

XY-Schreiber Servogor RE 551
Goerz Elektro Ges., A 1101 Wien

Flüssigkeitsszintillationszähler Tri Carb Mod. 574
Packard, D 6000 Frankfurt/Main

Thermoelement "Tastotherm"
Deutsche Gulton, D 6000 Frankfurt/Main

Schoellerschall Reinigungswanne
Schoeller, D 6000 Frankfurt/Main

Gefriertrocknungsanlage Typ L2
WKF, D 6101 Brandau/Darmstadt

Gaze: Verbandmull
Fa. Hartmann, D 7920 Heidenheim/Brenz

2. Chemikalien

2.1. Anorganische und organische Chemikalien

L-Milchsäure, Schuchardt, D 8000 München

Carbogen (95% O_2 /5% CO_2), Linde, D 8000 München

L-Carnitin, Otsuka Pharmaceutical
Tokushima, Japan

Aktivkohle Norit A, DL-Carnitin
Serva, D 6900 Heidelberg

Ionenaustauscher AG 50 Wx8 (H^+ -Form)
BioRad, D 8000 München

Trockeneis, Agefco, D 8000 München

Dioxan Rotitainer Qualität
Roth, D 7500 Karlsruhe

Heparin "Tromboliquine"
NV Organon Oss., Holland

Na-Pentobarbital "Nembutal"
Deutsche Abbott, D 6507 Ingelheim

NCS Tissue Solubilizer
Amersham Searle Arlingtonheight, Illinois, USA

Permablend III, Packard, D 6000 Frankfurt/Main

Carboxyatraktylosid, Na-Pyruvat, Triethanolamin
Boehringer, D 6800 Mannheim

Na-L-Laktat, Roth, D 7500 Karlsruhe

Silikonöle AR 20 und AR 200
Wacker, D 8263 Burghausen

Phenylsuccinat und α -Cyano-4-Hydroxycinnamat
EGA Chemie, D 7924 Steinheim

N-Ethylmaleinimid, Sigma, D 8021 Taufkirchen

1,2,3-Tricarboxybenzol
ICN Pharmaceuticals, Plainview, NY, USA

Alle anderen Chemikalien wurden von Merck, D 6100 Darmstadt,
als p.a. Substanzen bezogen.

2.2. Radiochemikalien

^3H -Acetyl-CoA, ^{14}C -Citronensäure
New England Nuclear, D 6072 Dreieich

L-4- ^{14}C -Asparaginsäure, ^3H -ATP, ^{14}C -ADP, ^{14}C -NaHCO₃, ^3H -Inulin
Amersham Buchler, D 3300 Braunschweig

2.3. Biochemikalien

Collagenase Typ CLS
Worthington, Freehold, NY, USA

Rinderserum Albumin
Behring, D 3550 Marburg

Lubrol WX, ICI, D 6000 Frankfurt/Main

Gelatine "non plus ultra", Aluminiumhydroxyd Gel C_γ
Avidin, 8-Lys-Vasopressin, Adrenalin, Isoproterenol
Serva, D 6900 Heidelberg

Phenylephrin, Roth, D 7500 Karlsruhe

Glutaminase, Sigma, D 8021 Taufkirchen

2-Oxoglutaratdehydrogenase wurde freundlicherweise von
Herrn Dr. Kolb aus unserem Institut zur Verfügung gestellt

Alle anderen Enzyme und Coenzyme wurden von Boehringer,
D 6800 Mannheim, bezogen. Enzymkristallsuspensionen wur-
den vor Verwendung zentrifugiert, der (NH₄)₂SO₄-Überstand
verworfen, und die Enzymkristalle in H₂O oder Puffer ge-
löst.

3. Tiermaterial

Männliche Sprague-Dawley Ratten von 160 - 250 g Gewicht wurden von W. Gassner, D 8741 Sulzfeld (September 1975 - März 1977) und von E. Jautz, D 7964 Kisslegg (April 1977 - September 1978) bezogen und unter Standardbedingungen ($22-24^{\circ}\text{C}$, 50% Feuchte, 12 h (7^{00} - 19^{00} Uhr) Licht) gehalten.

3.1. Standarddiät

Als Standarddiäten wurden Labortierfutter 57 Z (Zahn II, D 6832 Hockenheim, September 1975 - März 1977) und Heri-lan R/M 204 (H. Eggersmann, D 3260 Rinteln, April 1977 - September 1978) verwendet.

3.2. Biotinmangeldiät

Zur Erzeugung von Biotinmangel wurden 50 - 80 g schwere männliche Sprague-Dawley Ratten (E. Jautz, D 7964 Kisslegg) für 5-8 Wochen mit einer Spezialdiät ernährt. Die Diät, deren Proteinanteil ausschließlich aus Eier-Eiweiß besteht, wurde freundlicherweise im Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin der Universität München hergestellt, wofür ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. H. Zucker und Herrn Dr. H. Beck herzlich danke.

Die Biotinmangeldiät hatte folgende Zusammensetzung:

70,4% Cerelese	0,46% NaCl	0,001% KJ
20,0% Eiweiß-Albumin	0,08% MgO	0,001% NaF
4,0% Maisöl	0,045% Fe-Citrat	0,0001% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$
1,5% CaCO_3	0,034% $\text{MnSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	0,0729% native Maisstärke
1,0% $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	0,004% ZnCO_3	
1,0% K_2HPO_4	0,002% $\text{CuSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	0,4% Vitaminmischung

4 g Vitaminmischung enthielten:

100 mg Vitamin B ₁	20 µg Vitamin B ₁₂
15 mg Vitamin B ₂	250 mg Vitamin C
100 mg Nicotinsäure	5 mg Vitamin K ₃
100 mg Mesoinosit	1000 mg Cholinchlorid
40 mg Ca-d-Pantothenat	2000 E Vitamin D ₃
6 mg Pyridoxin	20000 E Vitamin A
4 mg Folsäure	Rest native Maisstärke
2 mg Paraaminobenzoesäure	

M e t h o d e n

1. Szintillationsflüssigkeit

5,5 g Permablend III (91% PPO, 9% Bis-MSB)

100 g Ethanol absolut

20 g Ethylenglykol

50 g Naphtalin

wurden ad 1 l mit technischem Dioxan gelöst.

2. Herstellung von 4-¹⁴C-Oxalacetat

4-¹⁴C-Oxalacetat wurde enzymatisch durch Transaminierung nach Rössle (192) hergestellt.

Bildung von 4-¹⁴C-Oxalacetat:

Ansatz:		Konz. im Ansatz:	
1 M Tris pH 7,2	0,02 ml	0,08	M
0,2 M 2-Oxoglutarat	0,2 ml	0,16	M
L-4- ¹⁴ C-Aspartat (32 mCi/mMol)	0,02 ml	0,448	mM
Aspartataminotransferase	0,01 ml	16	U/ml

Das Reaktionsgemisch wurde 20 min bei 25°C inkubiert.
Dann wurden 0,2 ml des Ansatzes auf eine kleine Säule

aufgetragen (0,7 g AG W X 8 200-400 mesh (H^+ -Form), Säule 0,5x5 cm). Nach dem Durchlaufen der aufgetragenen 0,2 ml wurde mit 0,6 ml H_2O eluiert. Im Eluat war alles $4-^{14}C$ -Oxalacetat enthalten. Nach Neutralisation mit 1 N KOH (ca. 0,05 ml) wurde die Radioaktivität eines Aliquots von 0,01 ml im Szintillationszähler bestimmt, um die für die Oxalacetatbestimmung notwendige Verdünnung zu berechnen. Die Ausbeute des Umsatzes betrug 50 -60%.

3. Herstellung fettfreien Albumins

Rinderserum-Albumin wurde nach der Vorschrift von Chen (193) von Fettsäuren befreit.

Dazu wurden 5 g Albumin in 50 ml H_2O dest. gelöst und mit 7,5 g feuchter Aktivkohle (Norit A) verrührt. Nach Einstellen des pH auf 3,0 wurde das Gemisch 30 min bei $0^{\circ}C$ gehalten. Anschließend wurde 15 min bei 35000 x g zentrifugiert und dann durch ein Faltenfilter gegossen und mit 1 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Über Nacht wurde gegen 10 l H_2O dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Albumin wurde als 20%ige Lösung (2 g in 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung) bereitet und nach Dialyse gegen 1 l 0,9%ige NaCl-Lösung verwendet.

4. Herstellung einer 20 mM Oleat-Lösung

28 mg Ölsäure wurden in 4 ml 0,9% NaCl-Lösung auf ca. $60^{\circ}C$ erwärmt und nach Zugabe von 0,1 ml 1 N NaOH solange von Hand geschüttelt, bis sich alles Oleat gelöst hatte. Die Lösung wurde dann mit 0,9% NaCl ad 5 ml aufgefüllt. Oleat wurde in den Experimenten als Albumin-Komplex eingesetzt, dazu wurde die Oleat-Lösung 1:2 mit 20%igem Albumin in 0,9% NaCl verdünnt.

5. Herstellung von Ca-Phosphat-Gel

Calcium-Phosphat-Gel wurde nach der Vorschrift von Keilin und Hartree (194) bereitet.

66,6 g wasserfreies CaCl_2 wurden in 2 l H_2O gelöst, unter Rühren wurde eine Lösung von 151,2 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ in 1,5 l H_2O zugegeben. Nachdem sich das Gel abgesetzt hatte, wurde der Überstand abgesaugt und der Niederschlag solange gewaschen, bis der Überstand Chlorid-frei war. Dann wurde das Gel 20 min lang bei 10000 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit wenig H_2O klumpenfrei verrührt.

6. Anreicherung von Laktatdehydrogenase (LDH) aus Hefe (195)

Von frischer Bäckerhefe wurden 1300 g auf 37°C erwärmt und mit 80 ml Toluol vermennt. Nach einstündigem Stehen bei 37°C unter gelegentlichem Rühren hatte sich die Hefe verflüssigt. Es wurden 60 ml H_2O zugegeben und die Mischung 45 min bei 37°C gehalten. Unter Rühren wurden dann 1300 ml H_2O zugegeben. Mit 2 N KOH wurde der pH auf 7,5-8 eingestellt. Der Ansatz stand dann 48 Stunden bei Raumtemperatur und 48 Stunden bei $2-4^\circ\text{C}$, wobei gelegentlich gerührt wurde. Anschließend wurde 20 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Rohextrakt (ca. 1400 ml) hatte eine spezifische Aktivität von 0,039 U/mg Protein.

Fremdproteine wurden durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd-Gel (Alu-Gel S) entfernt. Dazu wurden insgesamt 500 ml Alu-Gel S benötigt. Etwa 5 min nach Zugabe des Gels wurde 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand (1700 ml) wurde dann einer Adsorption an Ca-Phosphat-Gel unterworfen. Im Vorversuch wurde ermittelt, daß zur vollständigen Adsorption der LDH an das Phosphatgel eine Gelmenge von 1700 ml notwendig war. Nach 10 min Zentrifuga-

tion bei 10000 x g enthielt der Überstand noch 10% der Aktivität und wurde verworfen. Der Niederschlag wurde fünfmal mit je 250 ml 1/15 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen. Dann wurde die LDH vom Niederschlag mit 200 ml 1/15 M KPO_4 pH 7,0 mit 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluiert. Die Elution wurde zweimal mit je 250 ml des gleichen Puffers wiederholt. Die vereinigten Eluate enthielten 48% der Rohextraktaktivität.

Anschließend wurde eine fraktionierte Ammonsulfatfällung durchgeführt. Nach portionsweiser Zugabe von 157 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Stehen für 30 min bei $0-2^\circ\text{C}$ wurde 20 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen.

Nach portionsweiser Zugabe von 181 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Stehen für 30 min bei $0-2^\circ\text{C}$ wurde 30 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 15,4 ml 1/15 KPO_4 pH 7,0 aufgenommen. Die spezifische Aktivität betrug 0,49 U/mg Protein. Die Ausbeute bezogen auf die Rohextraktaktivität betrug 15%, die Anreicherung war 13-fach.

7. Krebs-Henseleit Puffer

Als Standardpuffer für Zellisolation und Zellinkubation wurde Calcium-freier Krebs-Henseleit-Bikarbonatpuffer (KHB) (196) verwendet. Er wurde wie folgt bereitet:

1000 ml 0,9% NaCl
 210 ml 1,3% NaHCO_3
 40 ml 1,15% KCl
 10 ml 3,82% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 10 ml 2,11% KH_2PO_4

Um eine Verarmung der Zellen an Carnitin zu vermeiden, wurden routinemäßig 1,27 ml 2 M DL-Carnitin (2 mM Endkonzentration) zugesetzt (197).

8. Präparation isolierter Leberzellen

Männliche Sprague-Dawley Ratten wurden durch intraperitoneale Injektion von Nembutal (0,1 ml einer 5%igen Lösung je 100 g Körpergewicht) betäubt. Die Operationstechnik erfolgte nach Standardmethoden der Leberperfusion (198). Nach Freilegen der Leber und Kanülierung der Pfortader wurde die Leber mit Ca-freiem Krebs-Henseleit Puffer unter einem Druck von 50 cm H₂O-Säule durchströmt. Die ersten 50 ml Perfusat wurden verworfen, um Erythrozyten und Plasmaproteine zu eliminieren. Nach Herausschneiden aus dem Körper wurde die Leber in einer thermokonstanten (38°C) Perfusionskammer rezirkulierend mit 100 ml KHB bei einer Flußrate von 50 ml/min perfundiert. Das Perfusionsmedium wurde durch Begasen des Hauptreservoirs mit Carbogen (95% O₂/5% CO₂) oxygeniert.

Nach 5 min wurden 50 mg Collagenase (150 U/mg) in 2 ml KHB zugegeben und die Perfusion für ca. 20-30 min fortgesetzt. Anschließend wurde die Leber in 20 ml Ca-freiem Krebs-Henseleit-Bikarbonatpuffer (37°C) mit 1,5% Gelatine (KHB-G) mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten. Die Suspension wurde 2 min mit Carbogen durchperlt. Unverdaute Gewebestückchen wurden entfernt und die Zellsuspension durch vier Lagen Gaze in einen Zentrifugenbecher filtriert. Nach kurzem (ca. 5-10 sec) Durchperlen mit Carbogen wurde 60 sec bei 50 x g in einer Christ-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 30 ml KHB-G gewaschen, wobei sie jeweils vor dem Zentrifugieren 5-10 sec mit Carbogen begast wurden. Bei Versuchen, die dem Studium der Glukoneogenese dienten, enthielt der Puffer 2 mM Lysin, um die Glukosebildungsraten zu erhöhen (199,200). Anschließend wurden die Hepatozyten im gleichen Medium suspendiert (Konzentration 0,25-0,45 x 10⁸ Zellen/ml). Bis zum Beginn der Inkubation wurden die Zellen warm gehalten und regelmäßig Carbo-

gen über die Zellen geleitet. Die Qualität der Zellpräparation wurde durch Anfärben mit 0,2% Trypanblau in 0,9% NaCl festgestellt. Hepatozyten von gefütterten Ratten schlossen zu 90% Trypanblau aus, Hepatozyten gehungerter Ratten zu 95-98%.

9. Inkubation der Zellen

9.1. Ansatz für Kompartimentierungsexperimente (60)

Die Inkubationsmischung bestand aus 0,75 ml KHB-G, 0,01 ml 110 mM CaCl_2 , 0,1 ml 10% Albumin in 0,9% NaCl und 0,05 ml der jeweiligen Substratlösung. Über den Inkubationsansatz wurde vor Verschuß der Inkubationsgefäße für 5 min ein kräftiger Carbogenstrom geleitet. Nach Zugabe der Zellen (0,2 ml Zellsuspension $\hat{=}$ ca. 20 mg Trockengewicht) wurde 10 min in verschlossenen Plastik-Zentrifugenröhrchen (10x1,9 cm) in einem Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert (Frequenz 160/min).

9.2. Ansatz für Glukoneogenese Experimente (59)

Bei Experimenten, die dem Studium der Glukoneogenese dienten, wurde eine andere Zusammensetzung des Inkubationsgemisches gewählt: 0,6 ml KHB-G mit 2 mM Lysin, 0,4 ml Serum normal gefütterter Ratten, 0,01 ml 110 mM CaCl_2 , 0,1 ml 10% Albumin in 0,9% NaCl und 0,05 ml des jeweiligen Substrats. Das Gemisch wurde 5 min mit Carbogen bei Zimmertemperatur begast. Nach Zugabe der Zellen wurde 30 min vorinkubiert, danach wurden 0,1 ml vom Inkubationsansatz für analytische Zwecke entnommen und der jeweilige Effektor (5 μ l einer Stammlösung bzw. des Lösungsmittels) zugegeben. Nach weiteren 10 min wurden 0,1 ml der Inkubationsmischung enteiweißt und der Rest des Inkubationsansatzes zur Fraktionierung verwendet.

10. Zellfraktionierung

10.1. Herstellung der Gesamtzellextrakte (58,84)

Zur Herstellung der Gesamtzellextrakte mußten die Zellen vom Inkubationsmedium getrennt werden. Dazu wurden 0,4 ml der Inkubationsmischung in ein bei 37°C thermostatisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, das 0,24 ml 12%ige HClO_4 und darüber 0,5 ml Silikonöl (AR 200 : AR 20 = 3:1) enthielt. Nach 10 sec Zentrifugation bei 13000 x g in einer Eppendorf-Zentrifuge wurden der wässrige Überstand und die Ölschicht sorgfältig abgesaugt und der HClO_4 -Niederschlag zweimal mit je 0,4 ml 12%iger HClO_4 extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 10 N KOH mit 0,1 M Tris im Eisbad neutralisiert.

10.2. Digitonin Methode

Die Digitoninmethode wurde in der von Siess und Wieland (88) modifizierten Art durchgeführt. Dazu wurden 0,2 ml des Inkubationsgemisches zu 1 ml 0°C kalter Digitoninlösung (4 mg Digitonin pro ml KHB mit 3 mM EDTA) gegeben und 15 sec auf einem Rotationsmischer gemischt. 1 ml dieser Mischung (Temperatur 4°C) wurde dann in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, das 0,12 ml 12%ige HClO_4 und darüber 0,5 ml Silikonöl (AR 200 : AR 20 = 1:2) enthielt. 30 sec nach Zugabe der Inkubationsmischung zum Digitoninmedium wurde die Eppendorf-Zentrifuge gestartet und 10 sec bei 13000 x g zentrifugiert.

In einigen Experimenten wurden 0,8 ml des Überstandes mit 0,2 ml 70%iger HClO_4 enteweißt, der restliche Überstand wurde samt der Ölschicht sorgfältig abgesaugt. Die HClO_4 -Phase wurde zweimal mit je 0,2 ml 12%iger HClO_4 extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 10 N KOH mit 0,1 M Tris im Eisbad neutralisiert.

10.3. Verschleppungsexperimente

Um das Ausmaß der Verschleppung von cytosolischen Metaboliten während der Digitoninbehandlung in die Mitochondrienfraktion zu bestimmen, wurden radioaktiv markierte Metabolite dem Digitoninmedium vor der Fraktionierung zugesetzt. Definierte Mengen des Überstandes, der Ölschicht, des Niederschlagextraktes und des Niederschlages (Auflösung mit 0,5 ml NCS Tissue Solubilizer) wurden mit Szintillationslösung versetzt und die in ihnen enthaltene Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

10.4. Herstellung der Extrakte zur Bestimmung der Ketonkörper- und Glukoseproduktion

Die Menge gebildeter Ketonkörper und Glukose wurde in perchlorsauren Extrakten der gesamten Inkubationsmischung bestimmt. Dazu wurden 0,1 ml des Inkubationsansatzes rasch mit 0,02 ml 70%iger HClO_4 gemischt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 10 N KOH mit 0,1 M Tris neutralisiert.

11. Analytische Methoden

11.1. Oxalacetatbestimmung

Oxalacetat wurde mit einem neu entwickelten enzymatischen Isotopenverdünnungstest (53,58) bestimmt. Der Test arbeitet nach dem Prinzip der Isotopenverdünnung. 4- ^{14}C -Oxalacetat wird mit einer limitierenden Menge Acetyl-CoA mit Citratsynthase zu ^{14}C -Citrat umgesetzt.

Dazu war es notwendig, das in den Zellextrakten in unterschiedlicher Menge enthaltene Acetyl-CoA vorher komplett zu verseifen. Hierzu wurden die Extrakte mit 10 N KOH auf pH 12 eingestellt und 30 min bei 25°C inkubiert. Bei unseren Kontrollversuchen erwies sich Oxalacetat unter die-

sen Bedingungen als stabil (siehe auch 54). Der pH-Wert wurde dann mit 70%iger HClO_4 auf 6,2 - 6,4 eingestellt und pro ml Extrakt 0,1 ml 1 M Tris pH 7,2 zugegeben. Als Leerwert wurde 12%ige HClO_4 der gleichen Prozedur unterworfen.

Testansatz:

Es wurden Doppelwerte bestimmt und die Proben bei Bedarf mit Leerwert verdünnt.

In Plastiksintillationsgefäße wurde einpipettiert:

		Konz. im Test
1 M Tris pH 7,2	0,1 ml	86 mM
Probe	1,0 ml	
4- ^{14}C -Oxalacetat/Acetyl-CoA	0,02 ml	74 nM/55 nM
Start mit Citratsynthase	0,04 ml	12,6 U/ml

Um unspezifische Radioaktivität zu korrigieren, wurden parallel Reaktionsansätze mit Wasser an Stelle von Acetyl-CoA bestimmt.

Nach dem Start mit Citratsynthase wurde 90 min bei 30°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Oxalacetat, das nicht zu Citrat umgesetzt worden war, wurde nach Zugabe von 0,05 ml einer 1:2 Mischung von 12%iger HClO_4 und 1 M Citronensäure decarboxyliert, indem die Proben ca. 75 min bei 120°C erhitzt wurden. Sie waren dann nahezu trocken. Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit und Suspendieren des Rückstandes mit Hilfe von Ultraschall wurde die säurestabile Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

11.2. Acetyl-CoAbestimmung

Acetyl-CoA wurde mit der Methode von Rössle (192) bestimmt. Dabei wird 4- ^{14}C -Oxalacetat mit Acetyl-CoA enzymatisch durch Citratsynthase zu Citrat umgesetzt und der Einbau

an Radioaktivität ins Citrat gemessen. Die spezifische Radioaktivität des 4-¹⁴C-Oxalacetats ließ eine Bestimmung von 5 pMol Acetyl-CoA pro Bestimmungsansatz zu. In ein Plastikszintillationsgefäß wurden einpipettiert:

		Konz. im Test
1 M Tris pH 7,2	0,1 ml	0,16 M
H ₂ O	0,4 ml	
Probe	0,1 ml	
4- ¹⁴ C-Oxalacetat	0,02 ml	1,9 - 2,25 μ M
32 μ Ci/ μ Mol		
Citratsynthase	0,02 ml	6,9 U/ml

Nach dem Start mit Citratsynthase wurde 30 min bei 30°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,02 ml eines 1:2 Gemisches von 1 M Citronensäure und 12%iger HClO₄ gestoppt. Anschließend wurde das überschüssige ¹⁴C-Oxalacetat durch 45 min Erhitzen im Trockenschrank bei 120°C decarboxyliert. Die Proben wurden mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und zum Suspendieren des Rückstandes mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

11.3. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340 nm am Doppelstrahlspektrophotometer

Der molare Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm wurde durch Vergleich mit dem ϵ -Wert bei 334 nm bestimmt. Am Eppendorf-Photometer wurde die Konzentration einer NADH-Lösung durch enzymatischen Umsatz mit Laktatdehydrogenase bestimmt.

Mikroküvetten, 334 nm, 1 cm Lichtweg,

Konz. im Test

H ₂ O	0,25 ml	
0,1 M Pyruvat	0,01 ml	3,6 mM
10 mM NADH	0,005 ml	0,18 mM
Start mit LDH	0,01 ml	9,6 U/ml

Nach 1:21 Verdünnung wurde die NADH-Lösung in den gleichen Test am Doppelstrahlspektrophotometer eingesetzt.

Die Messungen am Doppelstrahlspektrophotometer wurden bei 340 nm als Meßwellenlänge und 420 nm als Referenzwellenlänge durchgeführt (Temperatur 30°C). (Aus technischen Gründen wurde bei Messungen von NADH-Abnahme die Wellenlängen vertauscht und 420 nm als Meßwellenlänge und 340 nm als Referenzwellenlänge gewählt.)

3 ml Vollküvetten, Meßwellenlänge 420 nm, Referenzwellenlänge 340 nm, Lichtweg 1 cm,

Konz. im Test

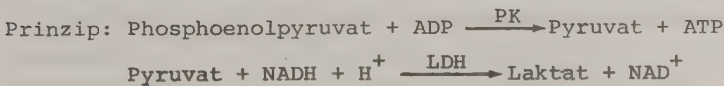
H ₂ O	2,5 ml	
0,1 M Pyruvat	0,1 ml	38 mM
10 mM NADH 1:21	0,005 ml	
Start mit LDH	0,05 ml	5 U/ml

Aus der erhaltenen Extinktionsänderung und der am Eppendorf-Photometer bestimmten Konzentration der NADH-Lösung wurde dann der molare Extinktionskoeffizient berechnet:

$$\epsilon = \frac{\Delta E}{c} = 6,32 \left[\text{cm}^2 / \mu\text{Mol} \right]$$

11.4. Adenosindiphosphatbestimmung

ADP wurde mit der Methode von Jaworek et al. (201) bestimmt.



MgSO₄ und KCl werden zur Aktivierung der Pyruvatkinase zugesetzt. Die Abnahme der NADH-Konzentration ist proportional zur ADP-Konzentration.

Reagenziengemisch:

	Konzentration
20 mg Phosphoenolpyruvat	2,64 mM
92,5 mg MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10,3 mM
400 mg KCl	147,4 mM
4,9 ml H ₂ O	
1,5 ml Laktatdehydrogenase	42,5 U/ml
30 ml 0,2 M Tris pH 7,5	165 mM

Pipettierschema: 3 ml Vollkuvetten, d = 1 cm,
420 nm Meßwellenlänge,
340 nm Referenzwellenlänge,

Konz. im Test

Reagenzienmischung	1,5 ml	
0,1 M Tris pH 7,4	0,7 ml	25,7 mM
10 mM NADH	0,01 ml	0,037 mM
Probe	0,5 ml	
Start mit PK	0,01 ml	2,45 U/ml

Die Reaktion war jeweils nach ca. 30 min vollständig abgelaufen.

11.5. Adenosinmonophosphatbestimmung

AMP wurde nach Jaworek et al. (201) bestimmt.

Prinzip: $\text{AMP} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{MK}} 2 \text{ADP}$

AMP wurde anschließend an die ADP-Bestimmung in der gleichen Kuvette bestimmt. Dabei wird AMP durch Myokinase mit dem beim ADP-Test gebildeten ATP zu 2 ADP umgesetzt. Je Molekül AMP werden bei der nachfolgenden Umsetzung mit

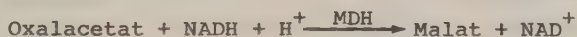
PK und LDH zwei Moleküle NADH verbraucht.

Pipettierschema: siehe ADP-Test. Nach Ablauf der ADP-Reaktion wurde mit 0,01 ml Myokinase (6,6 U/ml Endkonzentration) nachgestartet. Die Reaktion war jeweils nach ca. 30 min vollständig abgelaufen.

11.6. Aspartatbestimmung

Aspartat wurde wie von Bergmeyer et al. (202) beschrieben bestimmt.

Prinzip: $\text{L-Aspartat} + 2\text{-Oxoglutarat} \xrightarrow{\text{AAT}} \text{Glutamat} + \text{Oxalacetat}$



Die Abnahme der NADH-Konzentration ist der umgesetzten Aspartat-Menge proportional.

Pipettierschema: 3 ml Vollkuvetten, $d = 1 \text{ cm}$,
420 nm Meßwellenlänge,
340 nm Referenzwellenlänge,

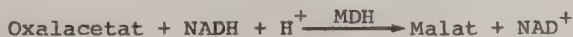
			Konz. im Test
0,1 M K-PO_4 Puffer pH 7,2	2,2 ml	78	mM
0,1 M 2-Oxoglutarat	0,1 ml	3,5	mM
10 mM NADH	0,01 ml	0,035	mM
Aspartataminotransferase	0,01 ml	2,8	U/ml
Probe	0,5 ml		
Start mit MDH	0,01 ml	8,5	U/ml

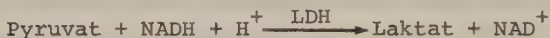
Nach ca. 15 - 20 min war die Reaktion vollständig abgelaufen.

11.7. Citratbestimmung

Citrat wurde mit der Methode von Dagley (203) bestimmt.

Prinzip: $\text{Citrat} \xrightarrow{\text{Cl}} \text{Oxalacetat} + \text{Acetat}$





Das verwendete Citratlyase-Präparat enthielt Oxalacetat-decarboxylase. Die NADH-Abnahme ist der umgesetzten Citratmenge proportional.

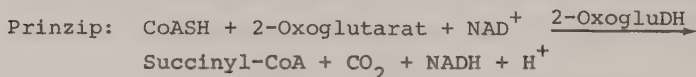
Pipettierschema: 3 ml Vollküvetten, d = 1 cm,
420 nm Meßwellenlänge,
340 nm Referenzwellenlänge,

			Konz. im Test
0,1 M Tris mit			81,0 mM
0,2 mM ZnCl ₂ pH 7,6	2,2 ml		0,16 mM
10 mM NADH	0,01 ml		0,37 mM
Probe	0,5 ml		
Malatdehydrogenase	0,005 ml		4,4 U/ml
Laktatdehydrogenase	0,005 ml		2 U/ml
Start mit Citratlyase	0,005 ml		0,15 U/ml

Nach ca. 20 min war die Reaktion jeweils vollständig abgelaufen.

11.8. Coenzym A-Bestimmung

Sollte Coenzym A bestimmt werden, so wurde den neutralisierten Extrakten Mercaptoethanol (Endkonzentration 5 mM) als SH-Gruppenschutz zugesetzt. Coenzym A wurde dann nach Garland (204) bestimmt.



Die Reaktion ist irreversibel, die Zunahme an NADH ist der umgesetzten CoA-Menge proportional.

Reagenziengemisch:

		Konzentration
0,1 M Arsenatpuffer pH 7,2	10,0 ml	93 mM
10 mM NAD ⁺	0,2 ml	0,19 mM
0,1 M 2-Oxoglutarat	0,4 ml	37 mM
EDTA · Na ₂	7,5 mg	1,87 mM
57 mM Cystein · HCl	0,2 ml	1,06 mM

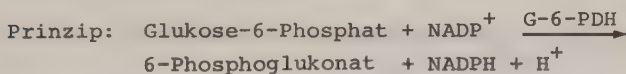
Pipettierschema: 3 ml Vollkuvetten, d = 1 cm,
 340 nm Meßwellenlänge,
 420 nm Referenzwellenlänge,

Reagenziengemisch	1,0 ml
H ₂ O	1,0 ml
Probe	0,5 ml
2-Oxoglutaratdehydrogenase	0,005 ml

Die Reaktion war jeweils nach etwa 5 min vollständig abgelaufen.

11.9. Glukose-6-Phosphatbestimmung

Glukose-6-Phosphat wurde mit der Methode von Lang und Michal (205) bestimmt.



Die Menge des gebildeten NADPH ist der Menge des umgesetzten Glukose-6-Phosphats proportional.

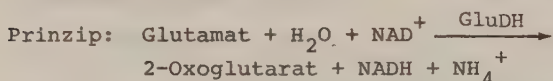
Pipettierschema: 3 ml Vollkuvetten, d = 1 cm,
 340 nm Meßwellenlänge,
 420 nm Referenzwellenlänge,

		Konz. im Test
0,2 M Tram pH 7,5	1,5 ml	115 mM
10 mM NADP ⁺	0,1 ml	0,038 mM
Probe	1,0 ml	
Start mit Glukose-6-Phosphatdehydrogenase	0,01 ml	1,59 U/ml

Die Reaktion war nach jeweils 15 min vollständig abgelaufen.

11.10. Glutamatbestimmung

Glutamat wurde nach Bernt und Bergmeyer (206) bestimmt.



2-Oxoglutarat wird als Hydrazon aus dem Gleichgewicht entfernt. ADP dient als Aktivator der Glutamatdehydrogenase. Das gebildete NADH ist der umgesetzten Glutamatmenge proportional.

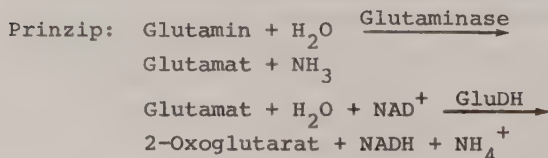
Pipettierschema: 3 ml Vollküvetten, d = 1 cm,
340 nm Meßwellenlänge,
420 nm Referenzwellenlänge,

		Konz. im Test
0,5 M Glycin mit		368 mM
0,4 M Hydrazin pH 9,0	2,0 ml	294 mM
33,5 mM ADP	0,1 ml	1,23 mM
27 mM NAD ⁺	0,1 ml	0,99 mM
Probe	0,5 ml	
Start mit Glutamatdehydrogenase	0,02 ml	8,8 U/ml

Die Reaktion war nach jeweils ca. 30 min vollständig abgelaufen.

11.11. Glutaminbestimmung

Glutamin wurde mit der Methode von Lund (207) bestimmt.



Glutamin wurde mit Glutaminase enzymatisch hydrolysiert. Das entstehende Glutamat wurde dann wie unter 11.10. beschrieben bestimmt.

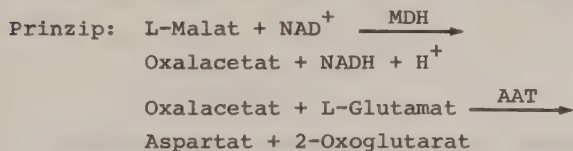
Hydrolyse:

		Konzentration
0,5 M Acetatpuffer pH 5,0	0,025 ml	65 mM
Probe	0,1 ml	
Glutaminase	0,005 ml	0,55 U/ml

Es wurde 60 min bei 37°C inkubiert.

11.12. Malatbestimmung

Malat wurde nach Möllering (208) bestimmt.



Das Gleichgewicht der Malatdehydrogenase wird durch Abfangen des Oxalacetats nach rechts verschoben. Die NADH-Bildung ist der umgesetzten Malatmenge proportional.

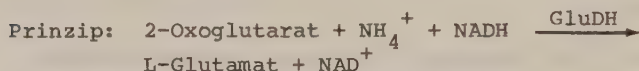
Pipettierschema: 3 ml Vollküvetten, d = 1 cm,
 340 nm Meßwellenlänge,
 420 nm Referenzwellenlänge,

		Konz. im Test
0,1 M 3-Aminopropanol-(1) pH 10,0	2,0 ml	71 mM
0,5 M Glutamat pH 10,0	0,2 ml	35,5 mM
27 mM NAD ⁺	0,1 ml	0,96 mM
Aspartataminotransferase	0,01 ml	2,8 U/ml
Probe	0,5 ml	
Start mit Malatdehydrogenase	0,01 ml	8,5 U/ml

Nach ca. 20 min war die Reaktion jeweils vollständig abgelaufen.

11.13. 2-Oxoglutaratbestimmung

2-Oxoglutarat wurde wie von Bergmeyer und Bernt (209) beschrieben bestimmt.



Die Abnahme der NADH-Konzentration ist proportional zur umgesetzten 2-Oxoglutaratmenge.

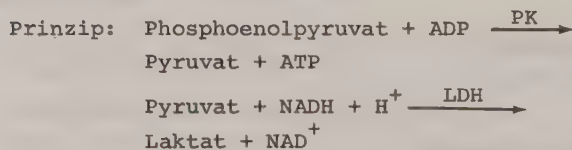
Pipettierschema: 3 ml Vollküvetten, $d = 1 \text{ cm}$,
420 nm Meßwellenlänge,
340 nm Referenzwellenlänge,

		Konz. im Test
0,3 M K-PO ₄ Puffer pH 7,5	2,0 ml	235 mM
8,5 mM NADH	0,02 ml	0,067 mM
1 M NH ₄ Cl	0,02 ml	7,8 mM
Probe	0,5 ml	
Start mit Glutamat-dehydrogenase	0,01 ml	4,71 U/ml

Nach ca. 10 min war die Reaktion jeweils vollständig abgelaufen.

11.14. Phosphoenolpyruvatbestimmung

Phosphoenolpyruvat wurde mit der Methode von Czok und Lamprecht (210) bestimmt.



MgSO₄ und KCl wurden zur Aktivierung der Pyruvatkinase zugesetzt. Die Menge des verbrauchten NADH ist der Phosphoenolpyruvatmenge proportional.

Pipettierschema: 3 ml Vollküvetten, $d = 1$ cm,
 420 nm Meßwellenlänge,
 340 nm Referenzwellenlänge,

		Konz. im Test
0,2 M Tris pH 7,5	2,0 ml	149 mM
0,25 M $MgSO_4$ mit		9,3 mM
1,85 M KCl	0,1 ml	69 mM
20 mM ADP	0,05 ml	0,37 mM
10 mM NADH	0,01 ml	0,037 mM
Laktatdehydrogenase	0,01 ml	4,1 U/ml
Probe	0,5 ml	
Start mit Pyruvatkinase	0,01 ml	2,5 U/ml

Die Reaktion war jeweils nach 10 min vollständig abgelaufen.

11.15. Pyruvatbestimmung

Pyruvat wurde nach Czok und Lamprecht (210) bestimmt.

Prinzip: $\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Laktat} + \text{NAD}^+$

Die Abnahme der NADH-Konzentration ist der Pyruvatmenge proportional.

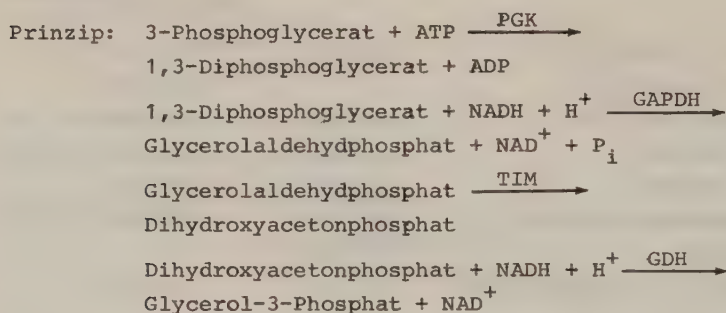
Pipettierschema: 3 ml Vollküvetten, $d = 1$ cm,
 420 nm Meßwellenlänge,
 340 nm Referenzwellenlänge,

		Konz. im Test
0,2 M Tris pH 7,5	2,2 ml	162 mM
10 mM NADH	0,01 ml	0,037 mM
Probe	0,5 ml	
Start mit Laktatdehydrogenase	0,01 ml	4 U/ml

Nach ca. 15 min war die Reaktion jeweils vollständig abgelaufen.

11.16. 3-Phosphoglyceratbestimmung

3-Phosphoglycerat wurde mit der Methode von Czok (211) bestimmt.



Pro Mol 3-Phosphoglycerat werden 2 Mole NADH verbraucht.

Pipettierschema: 3 ml Vollküvetten, $d = 1 \text{ cm}$,
420 nm Meßwellenlänge,
340 nm Referenzwellenlänge,

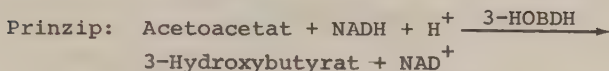
Konz. im Test

0,4 M Tris mit		211 mM
1 mM EDTA pH 7,6	1,5 ml	0,53 mM
0,2 M MgCl_2	0,1 ml	7 mM
0,1 M ATP	0,2 ml	7 mM
10 mM NADH	0,01 ml	0,035 mM
Glycerolaldehydphosphat-dehydrogenase	0,01 ml	1,9 U/ml
Trioseisomerase/Glycerol-phosphatdehydrogenase	0,01 ml	11,6 U/ml TIM 4 U/ml GDH
Probe	0,5 ml	
Start mit 3-Phosphoglyceratkinase	0,01 ml	10,6 U/ml

Nach ca. 45 min war die Reaktion jeweils vollständig abgelaufen.

11.17. Acetoacetatbestimmung

Acetoacetat wurde mit der Methode von Mellanby und Williamson (212) bestimmt.



Die Abnahme der NADH-Konzentration ist der umgesetzten Acetoacetatmenge proportional.

Reagenziengemisch: 0,3 mM NADH in 0,2 M Tris mit 4 mM EDTA pH 7,5

Um eine gelegentlich aufgetretene Trübung während des Tests zu verhindern, wurden 0,05 ml Probe mit 0,15 ml Reagenziengemisch und einem Enzym, das die Reaktion nicht stört (Hexokinase), in gleicher Konzentration wie die 3-Hydroxybutyratdehydrogenase 15 min vorinkubiert. Nach Zentrifugation wurde ein Aliquot von 0,17 ml in den Test eingesetzt.

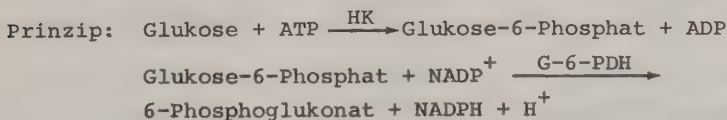
Pipettierschema: 0,25 ml Mikroküvetten, d = 1 cm,
334 nm Meßwellenlänge,

Konz. im Test

Vorinkubationsgemisch	0,17 ml	
H ₂ O	0,03 ml	
Start mit 3-Hydroxybutyratdehydrogenase	0,005 ml	0,48 U/ml

11.18. Adenosintriphosphatbestimmung

ATP wurde mit der Methode von Lamprecht und Trautschold (213) bestimmt.



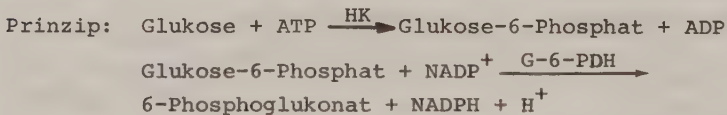
Die Zunahme der NADPH-Konzentration ist der ATP-Menge proportional.

Pipettierschema: 0,25 ml Mikroküvetten, $d = 1$ cm,
334 nm Meßwellenlänge,

		Konz. im Test
0,2 M Tram pH 7,5	0,1 ml	89 mM
Probe	0,1 ml	
10 mM NADP ⁺	0,005 ml	0,22 mM
0,1 M MgCl ₂	0,005 ml	2,2 mM
0,1 M Glukose	0,005 ml	2,2 mM
Glukose-6-Phosphat-dehydrogenase	0,005 ml	0,57 U/ml
Start mit Hexokinase	0,005 ml	1,13 U/ml

11.19. Glukosebestimmung

Glukose wurde mit der Methode von Bergmeyer et al. (214) bestimmt.



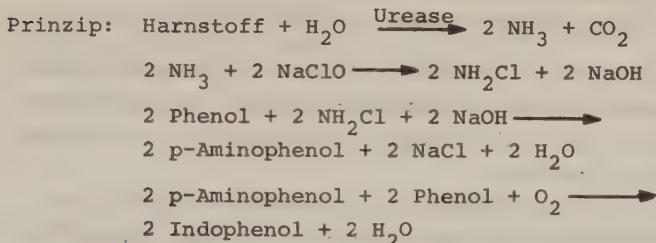
Die Menge des gebildeten NADPH ist der umgesetzten Glukosemenge proportional.

Pipettierschema: 0,25 ml Mikroküvetten, $d = 1$ cm,
334 nm Meßwellenlänge,

		Konz. im Test
50 mM Tram pH 7,5	0,200 ml	42,6 mM
Probe	0,010 ml	
0,1 M MgCl ₂	0,005 ml	2,2 mM
0,1 M ATP	0,005 ml	2,2 mM
10 mM NADP ⁺	0,005 ml	0,22 mM
Glukose-6-Phosphat-dehydrogenase	0,005 ml	0,57 U/ml
Start mit Hexokinase	0,005 ml	1,13 U/ml

11.20. Harnstoffbestimmung

Harnstoff wurde im zellfreien Inkubationsmedium (nicht perchlorsauer extrahiert) nach der Methode von Gutmann und Bergmeyer (215) bestimmt.



Die Farbintensität des Indophenols ist der Harnstoffkonzentration proportional.

Pipettierschema: Eppendorf-Reaktionsgefäße

50 mM Phosphatpuffer pH 6,5 0,01 ml
mit 2 mg Urease/ml

Probe 0,02 ml

Mischen, dann 10 min Inkubation bei 37°C.

Anschließend werden zugegeben:

0,106 M Phenol mit 0,17 mM Nitroprussid-Na 0,5 ml

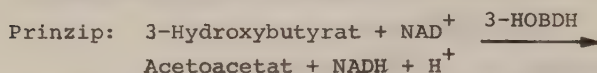
11 mM NaClO mit 0,125 N NaOH 0,5 ml

Mischen, dann 15 min Inkubation bei 37°C.

Anschließend wird die Extinktion bei 546 nm Meßwellenlänge gegen Luft bestimmt. Parallel zu den Proben wurde H_2O als Leerwert und eine Harnstoffstandardlösung der gleichen Prozedur unterworfen und eine Probe ohne Urease mitgezogen, um für endogenes NH_4^+ zu korrigieren. Die Extinktionen der Probenwerte wurden mit der Leerwertextinktion korrigiert.

11.21. 3-Hydroxybutyratbestimmung

3-Hydroxybutyrat wurde mit der Methode von Williamson und Mellanby (216) bestimmt.



Die Menge des gebildeten NADH ist der eingesetzten Menge des 3-Hydroxybutyrats proportional. Wegen der ungünstigen Gleichgewichtslage wird Acetoacetat als Hydrazon aus dem Gleichgewicht entfernt.

Um Trübungen in der Küvette zu verhindern, wurde - wie bei der Bestimmung von Acetoacetat - mit Hexokinase vorinkubiert.

Reagenziengemisch: Hydrazinhydrat 24%ig 20 ml
 Tris 0,2 M pH 8,5 10 ml
 0,1 M NAD^+ 0,5 ml

Pipettierschema: 0,25 ml Mikroküvetten, d = 1 cm,
 334 nm Meßwellenlänge,

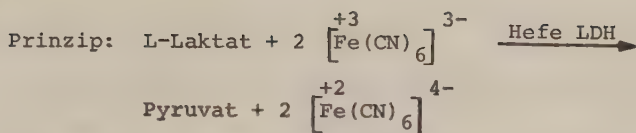
15 min Vorinkubation in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur:

Reagenziengemisch 0,15 ml
 Probe 0,05 ml
 Hexokinase 0,005 ml 23 U

Test: Konz.
 Vorinkubationsgemisch 0,17 ml
 H_2O 0,03 ml
 3-Hydroxybutyrat- 0,005 ml 0,48 U/ml
 dehydrogenase

11.22. Laktatbestimmung

Laktat wurde mit der Methode von Wieland und von Jagow-Westermann (217) bestimmt.



Die Menge des umgesetzten Hexacyanoferrats ist der eingesetzten Menge des Laktats proportional.

Pipettierschema: 0,25 ml Mikroküvetten, $d = 1 \text{ cm}$,
405 nm Meßwellenlänge,

		Konz. im Test
70 mM Na-Pyrophosphatpuffer pH 8,0	0,100 ml	31,1 mM
Probe	0,100 ml	
10 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0,020 ml	0,89 mM
Start mit Hefe LDH	0,005 ml	

11.23. Triglyceridbestimmung

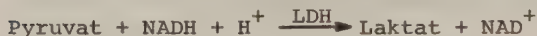
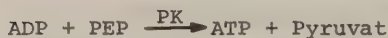
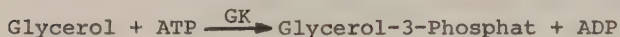
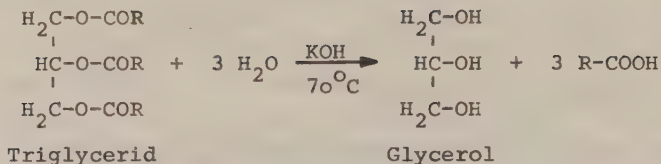
Extraktion

Die Extraktion der Triglyceride wurde wie von Entenman (218) beschrieben durchgeführt.

Leberzellen von 15 - 25 mg Trockengewicht wurden mit 0,3 ml Ethanol/Ether 3:1 20 sec auf Stufe 7 (Motor Typ RW 38, Fa. Janke & Kunkel/Staufen im Breisgau) mit einem Potter aufgeschlossen und das Homogenat anschließend 1 Stunde auf 56°C erhitzt. Nach Zentrifugieren und Abheben des Überstandes wurde mit der gleichen Menge Ethanol/Ether 3:1 ein zweites Mal homogenisiert und 1 Stunde auf 56°C erhitzt. Der Niederschlag wurde dann zweimal mit je 0,2 ml Ether aufgerührt und zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden über Nacht bei 60°C im Trockenschrank getrocknet.

Die Triglyceride wurden mit der Methode von Eggstein und Kuhlmann (219) bestimmt.

Prinzip:



Die Abnahme der NADH-Konzentration ist der Menge umgesetzten Glycerols proportional.

Reagenziengemisch:		Konzentration
0,1 M Tram pH 7,6	41,8 ml	83,6 mM
0,85 M MgCl_2	1,0 ml	17 mM
50 mM PEP	2,0 ml	2 mM
20 mM NADH	2,0 ml	0,8 mM
0,1 M ATP	2,0 ml	4 mM
Pyruvatkinase	1,0 ml	8 U/ml
Laktatdehydrogenase	0,2 ml	11 U/ml

Pipettierschema: 0,25 ml Mikroküvetten, d = 1 cm,
334 nm Meßwellenlänge,

Vorinkubation:

Reagenziengemisch	0,2 ml
Probe 1:11 in 0,1 M Tram pH 7,6 verdünnt	0,1 ml
0,1 M Tram pH 7,6	0,12 ml

Ausgefallene Mg-Salze der freien Fettsäuren werden abzentrifugiert.

Vorinkubationsgemisch	0,2 ml	
20 mM K-PO_4 pH 7,0 mit 1% Lubrol	0,02 ml	
Start mit Glycerokinase	0,005 ml	0,13 U/ml

11.24. Bestimmung der Pyruvatcarboxylaseaktivität

Die Aktivität der Pyruvatcarboxylase wurde mit der Methode von Deodhar und Mistry (70) bestimmt.

11.24.1. Extraktion der Pyruvatcarboxylase

11.24.1.1. Extraktion aus Lebergewebe

In der Reibschale unter flüssigem Stickstoff zerriebenes Lebergewebe wurde 1:11 mit 0,1 M $K-PO_4$ pH 7,2 mit 1 mM Glutathion und 0,5% Lubrol verrührt und nach zweimaligem Frieren und Tauen 4 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in die Pyruvatcarboxylasebestimmung eingesetzt. Wir stellten keinen Unterschied zwischen einem Aufschluß mit Ultraschall (220) und dem Aufschluß mit Lubrol fest (Ergebnisse nicht gezeigt).

11.24.1.2. Extraktion aus Leberzellen

Zur Trennung vom Inkubationsansatz wurden die Leberzellen durch 0,5 ml Silikonöl (AR 200 : AR 20 = 3:1) zentrifugiert (13000 x g). Nach Absaugen des Überstandes und des Öls wurde der Niederschlag eingefroren. Zur Extraktion wurde er dann 1:11 mit 0,1 M $K-PO_4$ pH 7,2 mit 1 mM Glutathion und 0,5% Lubrol vermischt und nach zweimaligem Frieren und Tauen 4 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Pyruvatcarboxylaseaktivität untersucht.

11.24.2. Pyruvatcarboxylasebestimmung

Die Aktivität der Pyruvatcarboxylase wurde über die Fixierung von $^{14}C-NaHCO_3$ in Gegenwart von Citratsynthase und eines Acetyl-CoA bildenden Systems bestimmt. Dazu wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert:

	Konz. im Test	
0,1 M Tris/HCl pH 7,4	0,125 ml	25 mM
25 mM ATP	0,050 ml	2,5 mM
H ₂ O	0,065 ml	
4,3 mM CoASH	0,050 ml	0,43 mM
Extrakt	0,050 ml	
0,125 M Acetyl-PO ₄	0,010 ml	2,5 mM
0,25 M MgSO ₄	0,010 ml	5 mM
Phosphotransacetylase	0,020 ml	4 U/ml
Citratsynthase	0,020 ml	0,88 U/ml
0,5 M ¹⁴ C-NaHCO ₃	0,050 ml	50 mM
Start mit 0,1 M Pyruvat	0,050 ml	10 mM

Nach 10 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 0,25 ml 10%iger Trichloressigsäure gestoppt. Nach 2 min Zentrifugation bei 13000 x g wurden 0,5 ml in Szintillationsgefäße überführt. Das überschüssige ¹⁴C-NaHCO₃ wurde durch fünfmaliges Vermischen mit Trockeneisbröckchen (ca. 0,5 g) ausgetrieben. Anschließend wurden 10 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

Zur Korrektur der unspezifischen ¹⁴C-Fixierung wurden Kontrollproben in Gegenwart von 1 mg Avidin (2,15 Einheiten) mitgezogen (220) und deren Radioaktivität vom Gesamt-¹⁴C-Einbau subtrahiert.

12. Berechnung der Metabolitkonzentrationen

Die Konzentrationen der Metabolite im Cytosol und in den Mitochondrien wurden auf folgenden Grundlagen durchgeführt.

1. 10⁸ Zellen entsprechen 1 g Frischgewicht (176).
2. 1 g Frischgewicht entspricht 0,29 ± 0,01 g (n = 30) Trockengewicht bei Zellen gehungerter Ratten und 0,42 ± 0,02 g (n = 15) Trockengewicht bei Zellen gefütterter

Ratten.

3. 1 g Frischgewicht enthalten 0,4 ml cytosolisches (221) und 0,048 ml mitochondriales (222,223) Wasser.

Die in den Tabellen gemachten statistischen Angaben wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Students t-Test für verbundene Stichproben berechnet.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Fußend auf einem Vorschlag von Zuurendonk und Tager (43) wurde eine Methode ausgearbeitet, die es erlaubt, durch rasche Fraktionierung isolierter Leberzellen in Anwesenheit von Digitonin die Verteilung von Metaboliten im cytosolischen und mitochondrialen Raum zu bestimmen. Die Validität dieser Methode wurde durch umfangreiche Kontrollversuche abgesichert. Mit dieser Methode wurde in isolierten Hepatozyten normal gefütterter Ratten die subzelluläre Verteilung von Oxalacetat, Malat, Citrat, 2-Oxoglutarat, Glutamat, Aspartat, Acetyl-CoA und Coenzym A bestimmt. Durch Inkubation mit verschiedenen Substraten (Laktat, Pyruvat, Alanin, Oleat plus Laktat, Ethanol und Aspartat) wurden die zellulären Gehalte der Metabolite stark verändert, während ihre Verteilung zwischen mitochondrialem und cytosolischem Kompartiment nahezu konstant blieb.

Aus den gemessenen Metabolitkonzentrationen in der Mitochondrienfraktion wurden die Quotienten der Reaktanten der Citratsynthase und der mitochondrialen Aspartatamino-transferase berechnet. Ein Vergleich mit der jeweiligen Gleichgewichtskonstanten zeigt, daß beide Enzyme in der Mitochondrienmatrix intakter Leberzellen das Gleichgewicht nicht einstellen.

Berechnet man die freie mitochondriale Oxalacetatkonzentration unter der Annahme, daß 3-Hydroxybutyratdehydro-

genase und Malatdehydrogenase das Gleichgewicht einstellen, und trägt diese Konzentrationen gegen die gemessene mitochondriale Citratkonzentration auf, so ergibt sich eine hyperbolische Sättigungskurve, aus der man einen apparenten K_m -Wert der Citratsynthase in vivo für Oxalacetat von $2 \mu\text{M}$ errechnen kann. Dieser Wert ist mit dem K_m -Wert gereinigter Rattenleber-Citratsynthase gut vergleichbar.

Die Ketonkörperbildung der Hepatozyten zeigte eine Korrelation mit dem mitochondrialen Acetyl-CoA/CoASH-Verhältnis.

2. In isolierten Hepatozyten gehungerter Ratten wurde der Einfluß von Glucagon und anderer Hormone auf Glukoneogenese und auf die subzelluläre Verteilung der Adeninnukleotide, von Acetyl-CoA, CoA, Glutamat, 2-Oxoglutarat, Malat, Oxalacetat, Pyruvat, Phosphoenolpyruvat, 3-Phosphoglycerat, Glukose-6-Phosphat, Aspartat und Citrat studiert.

Unter Glucagon stiegen die cytosolischen Gehalte von Malat, Phosphoenolpyruvat und 3-Phosphoglycerat um mehr als 60% und von Aspartat und Glukose-6-Phosphat um etwa 25% an, während Pyruvat um 37%, Glutamat und 2-Oxoglutarat um 70% gesenkt wurden.

In der Mitochondrienfraktion führte Glucagon zu einem Anstieg von ATP und Acetyl-CoA um 25% und von Phosphoenolpyruvat um 50%. 2-Oxoglutarat und Glutamat wurden durch Glucagon um 75% erniedrigt. Das cytosolische, und noch

mehr das mitochondriale NAD^+/NADH -Verhältnis wurde durch Glucagon zur reduzierten Seite hin verschoben.

Die Wirkungen des Glucagons auf Glukoneogenese, Ketogenese, den Redoxgrad der mitochondrialen Pyridinnukleotide und auf die zellulären Gehalte von 2-Oxoglutarat und Glutamat waren gleich abhängig von der Hormonkonzentration. Die Wirkung von Glucagon auf Ketogenese, die mitochondrialen Pyridinnukleotide und 2-Oxoglutarat- und Glutamatspiegel war im Biotinmangel voll erhalten, während die Glukoneogenese aus Laktat erniedrigt war und nicht mehr durch Glucagon stimuliert wurde.

Im Gegensatz zur Laktat-Glukoneogenese war die Glukoneogenese aus Glutamin, Dihydroxyaceton bzw. Fruktose im Biotinmangel unverändert und durch Glucagon stimulierbar.

Oleat führte nicht zu dem charakteristischen Abfall von 2-Oxoglutarat und Glutamat in Mitochondrien und Cytosol und erhöhte auch den Phosphoenolpyruvatgehalt in diesen Kompartimenten nicht. Die Glutamin-Glukoneogenese wurde durch Oleat nicht stimuliert.

Andere Stimulatoren der Glukoneogenese wie cyclo-AMP, Adrenalin, Vasopressin, Phenylephrin bzw. Isoproterenol führten alle (wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß) zu einem Abfall der C_5 -Dicarboxylate in Mitochondrien und Cytosol und zum Anstieg von Phosphoenolpyruvat. Zwischen dem Abfall des mitochondrialen 2-Oxoglutarats und dem Anstieg des Phosphoenolpyruvats ließ sich eine deutliche Korrelation herstellen. Alle der genannten Hormone und

cyclo-AMP führten - ähnlich wie Glucagon - zu einer Erhöhung des Redoxgrades der mitochondrialen Pyridinnukleotide.

Berechnungen der pH-Differenzen über die Mitochondrieninnenmembran aus der Anionenverteilung lassen darauf schließen, daß nur diejenigen Anionen nach einem gemeinsamen ΔpH über die Membran verteilt sind, deren Transport mit einem Cotransport (Citrat) oder Gegentausch (Pyruvat, Glutamat) von H^+ bzw. OH^- -Ionen verbunden ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Cori, C.F. (1956) in: Currents in Biochemical Research (Green, E. Ed.), S. 198-214 Interscience Publ. New York
- 2 Shepherd, D. & Garland, P.B. (1969) Biochem. J. 114, 597-610
- 3 Wieland, O., Matschinsky, F., Löffler, G. & Müller, U. (1961) Biochim. Biophys. Acta 53, 412-414
- 4 Adam, P.A. & Haynes, R.C. Jr. (1969) J. Biol. Chem. 244, 6444-6450
- 5 Garrison, J.C. & Haynes, R.C. Jr. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2769-2777
- 6 Yamazaki, R.K. & Haynes, R.C. Jr. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 166, 575-583
- 7 Titheradge, M.A. & Coore, H.G. (1976) FEBS Lett. 63, 45-50
- 8 Müllhofer, G., Loy, E., Wollenberg, P. & Krämer, R. (1974) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 239-254
- 9 Williamson, J.R., Browning, E.T., Thurman, R.G. & Scholz, R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5055-5064
- 10 Ross, B.D., Hems, R. & Krebs, H.A. (1967) Biochem. J. 102, 942-951
- 11 Ui, M., Exton, J.H. & Park, C.R. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5350-5359
- 12 Exton, J.H. & Park, C.R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 1424-1433
- 13 Riou, J.P., Claus, T.H., Flockhart, D.H., Corbin, J.D. & Pilakis, S.J. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4615-4619
- 14 Taunton, O.D., Stifel, F.B., Greene, H.L. & Herman, R.H. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7228-7239
- 15 Clark, M.G., Kneer, N.M., Bosch, A.L. & Lardy, H.A. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5695-5703
- 16 Schimmassek, H. & Mitzkat, H.J. (1963) Biochem. Z. 337, 510-518

- 17 Söling, H.D., Brand, I., Imesch, E., Unger, C., Lück, H.J. & Kuhn, A. (1978) Hormones and Cell Regulation (Dumont, J. & Nunez, J. Eds.) Vol 2, 209-225, Elsevier/North Holland, New York, Amsterdam, Oxford
- 18 Feliú, J.E., Hue, L. & Hers, H.-G. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2762-2766
- 19 Friedrichs, D. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J.M., Söling, H.D. & Williamson, J.R. Eds.) S.444-447 North Holland/American Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York
- 20 Pilkis, S.J., Riou, J.P. & Claus, T.H. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7841-7852
- 21 Rognstad, R. & Katz, J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1831-1833
- 22 Foster, J.L. & Blair, J.B. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 189, 263-276
- 23 van Berkel, T.J.C., Kruijt, J.K., Koster, J.F. & Hülsmann, W.C. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 917-925
- 24 van Berkel, T.J.C., Kruijt, J.K. & Koster, J.F. (1977) Biochim. Biophys. Acta 500, 267-276
- 25 van Berkel, T.J.C., Kruijt, J.K. & Koster, J.F. (1977) Eur. J. Biochem. 81, 423-432
- 26 Feliú, J.E., Hue, L. & Hers, H.-G. (1977) Eur. J. Biochem. 81, 609-617
- 27 Chan, T.M. & Exton, J.H. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6393-6400
- 28 Pilkis, S.J., Pilkis, J. & Claus, T.H. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 139-146
- 29 Blair, J.B., Cimbala, M.A., Foster, J.L. & Morgan, R.A. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3756-3762
- 30 Veneziale, C.M., Gabrielli, F. & Lardy, H.A. (1970) Biochemistry 9, 3960-3970
- 31 Veneziale, C.M. (1971) Biochemistry 10, 2793-2798
- 32 Veneziale, C.M. (1972) Biochemistry 11, 3286-3289

- 33 Blair, J.B., Cook, D.E. & Lardy, H.A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3601-3607
- 34 Blair, J.B., Cook, D.E. & Lardy, H.A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3608-3614
- 35 Ui, M., Claus, T.H., Exton, J.H. & Park, C.R. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5344-5349
- 36 Parilla, R., Jiminez, I. & Ayuso-Parilla, M. (1975) Eur. J. Biochem. 56, 375-383
- 37 Parilla, R., Jiminez, M.-I. & Ayuso-Parilla, M.S. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 174, 1-12
- 38 Williamson, J.R. (1967) Adv. Enzyme Regul. 5, 229-255
- 39 Teufel, H., Menahan, L.A., Shipp, J.C., Böning, S. & Wieland, O.H. (1967) Eur. J. Biochem. 2, 182-186
- 40 Holzer, H., Schultz, G. & Lynen, F. (1956) Biochem. Z. 328, 252-263
- 41 Gumaa, K.A., McLean, P. & Greenbaum, A.L. (1971) Essays Biochem. 7, 39-86
- 42 Elbers, R., Heldt, H.W., Schmucker, P., Soboll, S. & Wiese, H. (1974) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 378-393
- 43 Zuurendonk, P.F. & Tager, J.M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 333, 393-399
- 44 Colbeau, A., Nachbaur, J. & Vignais, P.M. (1971) Biochim. Biophys. Acta 249, 462-492
- 45 Tischler, M.E., Hecht, P. & Williamson, J.R. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 181, 278-292
- 46 Cook, G.A., Sullivan, A.C. & Ontko, J.A. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 179, 310-321
- 47 Harris, R.A. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 169, 168-180
- 48 Greenbaum, A.L., Gumaa, K.A. & McLean, P. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 143, 617-663
- 49 Williamson, D.H. & Brosnan, J.T. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U. Ed.) Band 2 S. 2187-2220 Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- 50 Kondrup, J. & Grunnet, N. (1973) Biochem. J. 132, 373-379

- 51 Veech, R.L., Eggleston, L.V. & Krebs, H.A. (1969) Biochem. J. 115, 609-619
- 52 Spencer, A.F. & Lowenstein, J.M. (1967) Biochem. J. 103, 342-348
- 53 Siess, E.A., Brocks, D.G. & Wieland, O.H., (1976) FEBS Lett. 70, 51-55
- 54 Löffler, G. & Wieland, O. (1963) Biochem. Z. 336, 447-454
- 55 Eschenbrenner, F. & Guynn, R.W. (1976) Anal. Biochem. 72, 220-229
- 56 Scholz, R. (1968) in: Stoffwechsel der Isoliert Perfundierten Leber (Staib, W. & Scholz, R. Eds.) S. 25-47, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- 57 Siess, E.A. & Wieland, O.H. (1975) FEBS Lett. 52, 226-230
- 58 Brocks, D. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Universität München
- 59 Siess, E.A., Brocks, D.G., Lattke, H.K. & Wieland, O.H. (1977) Biochem. J. 166, 225-235
- 60 Siess, E.A., Brocks, D.G. & Wieland, O.H. (1978) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 785-798
- 61 Struck, E., Ashmore, J. & Wieland, O.H. (1965) Biochem. Z. 343, 107-110
- 62 Struck, E., Ashmore, J. & Wieland, O.H. (1966) Adv. Enzyme Regul. 4, 219-224
- 63 Schimassek, H. (1967) in: Wirkungsmechanismen der Hormone (Karlson, P. Ed.) S. 33-50, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- 64 Siess, E.A., Brocks, D.G. & Wieland, O.H. (1978) Biochem. J. 172, 517-521
- 65 Williamson, D.H., Lund, P. & Krebs, H.A. (1967) Biochem. J. 103, 514-527
- 66 Wieland, O.H., Siess, E.A., Brocks, D.G. & Lattke, H.K. (1978) in: Hormones and Cell Regulation, Band 2 S. 227-247 (Dumont, J. & Nunez, J. Eds.) Elsevier/ North Holland, New York, Amsterdam, Oxford

- 67 McGarry, J.D., Wright, P.H. & Foster, D.W. (1975) J. Clin. Invest. 55, 1202-1209
- 68 Patel, M.S. & Mistry, S.P. (1968) J. Nutr. 96, 409-414
- 69 Wollenberger, A., Krause, E.G. & Wahler, B.E. (1958) Naturwissenschaften 45, 294
- 70 Deodhar, A.D. & Mistry, S.P. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 755-759
- 71 Cook, G.A., Nielsen, R.C., Hawkins, R.A., Mehlman, M.A., Lakshmanan, M.R. & Veech, R.L. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4421-4424
- 72 Veneziale, C.M. (1971) Biochemistry 10, 3443-3447
- 73 Veneziale, C.M., Lohmar, P.H. & Swenson, R. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7786-7791
- 74 Söling, H.D., Willms, B. Friedrichs, D. & Kleineke, J. (1968) Eur. J. Biochem. 4, 364-372
- 75 Williamson, J.R., Browning, E.T. & Scholz, R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4607-4616
- 76 Johnson, M.E.M., Das, N.M., Butcher, F.R. & Fain, J.N. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3229-3235
- 77 Krebs, H.A., Cornell, N.W., Lund, P. & Hems, R. (1974) in: Alfred Benzon Symposium 6th: Regulation of Hepatic Metabolism (Lundquist, F. & Tygstrup, N. Eds.) S. 726-750, Munksgaard, Copenhagen
- 78 Siess, E.A. & Wieland, O.H. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 323-330
- 79 Williamson, J.R., Garcia, A., Renold, A.E. & Cahill, G.F. (1966) Diabetes 15, 183-187
- 80 Williamson, J.R., Herczeg, B. Coles, H. & Danish, R. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 437-442
- 81 Ross, B.D., Hems, R., Freedland, R.A. & Krebs, H.A. (1967) Biochem. J. 105, 869-875
- 82 Exton, J.H., Corbin, J.G. & Park, C.R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4095-4102
- 83 Fröhlich, J. & Wieland, O.H. (1971) Eur. J. Biochem. 19, 557-562

- 84 Siess, E.A., Brocks, D.G. & Wieland, O.H. (1976) FEBS Lett. 69, 265-271
- 85 Siess, E.A., Brocks, D.G. & Wieland, O.H. (1979) Biochem. Soc. Trans. 6, 1139-1144
- 86 Tischler, M.E., Friedrichs, D., Coll, K. & Williamson, J.R. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 184, 222-236
- 87 Krebs, H.A. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. M., Söling, H.D. & Williamson, J.R. Eds.) S. 261-264, North Holland/American Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York
- 88 Siess, E.A. & Wieland, O.H. (1976) Biochem. J. 156, 91-102
- 89 Akerboom, T.P.M., Bookelman, H., Zuurendonk, P.F., van der Meer, R. & Tager, J.M. (1978) Eur. J. Biochem. 84, 413-420
- 90 Zuurendonk, P.F. & Tager, J.M. (1974) in: Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation (Azzone, G.F., Klingenberg, M.E., Quagliariello, E. & Sili-prandi, N. Eds.) S. 257-263, North Holland, Amsterdam
- 91 Zuurendonk, P.F., Akerboom, T.P.M. & Tager, J.M. (1977) in: Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems (Thurman, R.G., Williamson, J.R., Drott, H. & Chance, B. Eds.) Vol III, 35-45, Academic Press, New York
- 92 Soboll, S., Scholz, R., Freisl, M., Elbers, R. & Heldt, H.W. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J.M., Söling, H.D. & Williamson, J.R. Eds.) S. 29-40 North Holland/American Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York
- 93 Soboll, S. (1977) Dissertation, Fachbereich für Chemie, Biologie und Geowissenschaften, Technische Universität München
- 94 Soboll, S., Scholz, R. & Heldt, H.W. (1978) Eur. J. Biochem. 87, 377-390
- 95 Sies, H., Akerboom, T.P.M. & Tager, J.M. (1977) Eur. J. Biochem. 72, 301-307
- 96 Katz, N. & Jungermann, K. (1976) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 359-375

- 97 Williamson, J.R. (1969) in: The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria (Papa, S., Tager, J.M., Quagliariello, E. & Slater, E.C. Eds.) S. 385-400, Adriatica Editrice, Bari
- 98 Veech, R.L., Rajman, L. & Krebs, H.A. (1970) Biochem. J. 117, 499-503
- 99 Patzelt, C., Löffler, G. & Wieland, O.H. (1973) Eur. J. Biochem. 33, 117-122
- 100 Portenhauser, R. & Wieland, O.H. (1972) Eur. J. Biochem. 31, 308-314
- 101 Utter, M.F. & Fung, C.H. (1971) in: Regulation of Gluconeogenesis (Söling, H.D. & Willms, B. Eds.) S. 1-10, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Academic Press, New York
- 102 McClure, W.R. & Lardy, H.A. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3591-3596
- 103 Kleineke, J. & Söling, H.D. (1971) in: Regulation of Gluconeogenesis (Söling, H.D. & Willms, B. Eds.) S. 20-24, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Academic Press, New York
- 104 von Glutz, G. & Walter, P. (1976) FEBS Lett. 72, 299-303
- 105 Barrit, G., Zander, G.L. & Utter, M.F. (1976) in: Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species (Hanson, R.W. & Mehlman, M.A. Eds.) S. 3-46, J. Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto
- 106 Stucki, J.W., Brawand, F. & Walter, P. (1972) Eur. J. Biochem. 27, 181-191
- 107 Palmieri, F., Stipani, I., Quagliariello, E. & Klingenberg, M. (1972) Eur. J. Biochem. 26, 587-594
- 108 Cheema-Dhadli, S. & Halperin, M.L. (1976) Can. J. Biochem. 54, 171-177
- 109 Palmieri, F., Prezioso, G., Quagliariello, E. & Klingenberg, M. (1971) Eur. J. Biochem. 22, 66-74
- 110 Palmieri, F., Quagliariello, E. & Klingenberg, M. (1972) Eur. J. Biochem. 29, 408-416
- 111 Tischler, M.E., Pachence, J., Williamson, J.R., LaNoue, K.F. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 173, 448-462

- 112 Bradford, N.M. & McGivan, J.D. (1973) Biochem. J. 134, 1023-1029
- 113 Meyer, J. & Vignais, P.M. (1973) Biochim. Biophys. Acta 325, 375-384
- 114 Sluse, F.E., Ranson, M. & Liébecq, C. (1972) Eur. J. Biochem. 25, 207-217
- 115 Wieland, O.H., Siess, E.A., von Funcke, H.J., Patzelt, C., Schirmann, A., Löffler, G. & Weiss, L. (1972) in: Metabolic Interconversion of Enzymes (Wieland, O.H., Helmreich, E. & Holzer, H. Eds.) S. 293-309, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- 116 Roche, T.E. & Cate, R.L. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 183, 664-677
- 117 Lowenstein, J.M. (1968) in: The Metabolic Roles of Citrate (Goodwin, T.W. Ed.) S. 61-86, Academic Press, London, New York
- 118 Hashimoto, T. & Numa, S. (1971) Eur. J. Biochem. 18, 319-331
- 119 Carlson, C.A. & Kim, K.H. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 164, 490-501
- 120 Palmieri, F., Quagliarielle, E. & Klingenberg, M. (1970) Eur. J. Biochem. 17, 230-238
- 121 Padan, E. & Rottenberg, H. (1973) Eur. J. Biochem. 40, 431-437
- 122 Papa, S., Lofrumento, N.E., Kanduc, D. Paradies, G. & Quagliariello, E. (1971) Eur. J. Biochem. 22, 134-143
- 124 Papa, S. & Paradies, G. (1974) Eur. J. Biochem. 49, 265-274
- 125 Halestrap, A.P. (1975) Biochem. J. 148, 85-96
- 126 McGivan, J.D. & Klingenberg, M. (1971) Eur. J. Biochem. 20, 392-399
- 127 Matlib, M.A., Boesman-Finkelstein, M. & Srere, P.A. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 191, 426-430

- 128 Srere, P.A. (1976) in: Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Tissues (Hanson, R.W. & Mehlman, M.R. Eds.) S. 153-161, J. Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto
- 129 Lee, L. & Fritz, I. (1972) Can. J. Biochem. 50, 120-127
- 130 Lopes-Cardozo, M. & van den Bergh, S.G. (1972) Biochim. Biophys. Acta 283, 1-15
- 131 Lehninger, A.L. (1946) J. Biol. Chem. 164, 291-306
- 132 Breusch, F.L. (1948) Advan. Enzymol. 8, 343-423
- 133 Wieland, O.H. (1968) Adv. Metabolic Disorders (Levine, R. & Luft, R. Eds.) Vol 3, 1-47, Academic Press, New York, London
- 134 Sols, A. & Marco, R. (1970) Curr. Top. Regul. 2, 227-273
- 135 Stern, J.R., Ochoa, S. & Lynen, F. (1952) J. Biol. Chem. 198, 313-321
- 136 Guynn, R.W., Harris, J.G. & Veech, R.L. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6957-6965
- 137 Gumaa, K.A., McLean, P. & Greenbaum, A.L. (1973) FEBS Lett. 29, 193-196
- 138 Smith, C.M. & Williamson, J.R. (1971) FEBS Lett. 18, 35-38
- 139 Wieland, O.H., Weiss, L. & Eger-Neufeldt, I. (1964) Biochem. Z. 339, 501-513
- 140 Moriyama, T. & Srere, P.A. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3217-3223
- 141 Bewsher, P.D. & Ashmore, J. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 431-436
- 142 Williamson, J.R., Kreisberg, R.A. & Felts, P.W. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 247-254
- 143 Williamson, J.R., Wright, P.H., Malaisse, W.F. & Ashmore, J. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 765-770
- 144 Williamson, J.R., Browning, E.T., Scholz, R., Kreisberg, R.A. & Fritz, I.B. (1968) Diabetes 17, 194-208

- 145 Williamson, J.R., Scholz, R. & Browning, E.T. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4617-4627
- 146 Exton, J.H., Malette, L.E., Jefferson, L.S., Wong, E.H.A., Friedmann, N., Miller, T.B. Jr. & Park, C.R. (1970) *Recent Progr. Hormone Res.* 26, 411-457
- 147 Exton, J.H., Robison, G.A., Sutherland, E.W. & Park, C.R. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6166-6177
- 148 Tolbert, M.E.M. & Fain, J.N. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1162-1166
- 149 Halestrap, A.P. (1978) *Biochem. J.* 172, 389-398
- 150 Söling, H.D., Willms, B., Kleineke, J. & Gehlhoff, M. (1970) *Eur. J. Biochem.* 16, 289-302
- 151 Seufert, D., Herlemann, E.M., Albrecht, E. & Seubert, W. (1971) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 459-478
- 152 Titheradge, M.A. & Coore, H.G. (1976) *FEBS Lett.* 71, 73-78
- 153 Prpic, V., Spencer, T.L. & Bygrave, F.L. (1978) *Biochem. J.* 176, 705-714
- 154 Scrutton, M.C. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7057-7067
- 155 Kleineke, J. & Söling, H.D. (1971) in: *Regulation of Gluconeogenesis* (Söling, H.D. & Willms, B. Eds.) S. 20, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Academic Press, New York
- 156 Walter, P. & Stucki, J.W. (1971) in: *Regulation of Gluconeogenesis* (Söling, H.D. & Willms, B. Eds.) S. 60, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Academic Press, New York
- 157 Haynes, R.C. Jr. (1972) in: *Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (Mehlman, M.A. & Hanson, R.W. Eds.) S. 239-252, Academic Press, New York, London
- 158 Scrutton, M.C. & White, M.D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5405-5415
- 159 Lardy, H.A., Paetkau, V. & Walter, P. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53, 1410-1414
- 160 Siess, E.A. & Wieland, O.H. (1978) *FEBS Lett.* 93, 301-306

- 161 Nordlie, R.C. & Lardy, H.A. (1963) J. Biol. Chem. 238, 589-598
- 162 Usatenko, M.S. (1970) Biochemical Medicine 3, 298-310
- 163 Saggerson, E.D. & Evans, C.J. (1975) Biochem. J. 146, 329-332
- 164 Ljungström, O., Hjelmquist, G. & Engström, L. (1974) Biochim. Biophys. Acta 358, 289-298
- 165 Riou, J.P., Claus, T.H. & Pilgis, S.J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 656-659
- 166 Ishibashi, H. & Cottam, G.L. (1978) J. Biol. Chem. 253, 8767-8771
- 167 Scrutton, M.C. & Utter, M.F. (1968) Annu. Rev. Biochem. 37, 249-302
- 168 Carlson, C.W., Baxter, R.C., Ulm, E.H. & Pogell, B.M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5555-5561
- 169 Pogell, B.M., Taketa, K. & Sarngadharan, M.G. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1947-1948
- 170 Proffitt, R.T., Sankaran, L. & Pogell, B.M. (1976) Biochemistry 15, 2918-2925
- 171 Menahan, L.A. & Wieland, O.H. (1969) Eur. J. Biochem. 9, 55-62
- 172 Claycomb, W.C. & Kilsheimer, G.S. (1969) Endocrinology 84, 1179-1183
- 173 Rozengurt, E., Jiminez de Asua, L. & Carmina, H. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3142-3147
- 174 Llorente, P., Marco, R. & Sols, A. (1970) Eur. J. Biochem. 13, 45-54
- 175 Ljungström, O., Berglund, L. & Engström, L. (1976) Eur. J. Biochem. 68, 497-506
- 176 Zahlten, R.W., Stratman, F.W. & Lardy, H.A. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3213-3218
- 177 Bücher, Th. & Klingenberg, M. (1958) Angew. Chem. 70, 552-570
- 178 Krebs, H.A. (1966) Adv. Enzyme Regul. 5, 409-434

179. Krebs, H.A. & Veech, R.L. (1969) in: The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria (Papa, S., Tager, J.M., Quagliariello, E. & Slatèr, E.C. Eds.) S. 329-340, Adriatica Editrice, Bari
- 180 Veech, R.L. & Mehلمان, M.A. (1972) in: Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Mehlman, M.A. & Hanson, R.W. Eds.) S. 171-183, Academic Press, New York
- 181 Exton, J.H., Ui, M., Lewis, S.B. & Park, C.R. (1971) in: Regulation of Gluconeogenesis (Söling, H.D. & Willms, B. Eds.) S. 160-178, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Academic Press, New York
- 182 Hems, D.A. & Whitton, P.D. (1973) Biochem. J. 136, 705-709
- 183 Whitton, P.D., Rodrigues, L.M. & Hems, D.A. (1978) Biochem. J. 176, 893-898
- 184 Hue, L., Feliu, J.F. & Hers, H.G. (1978) Biochem. J. 176, 791-797
- 185 Garrison, J.C. & Haynes, R.C. Jr. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5333-5343
- 186 Bryła, J., Harris, E.J. & Plumb, J.A. (1977) FEBS Lett. 80, 443-448
- 187 Pilkis, S.J., Claus, T.H., Johnson, R.A. & Park, C.R. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6328-6336
- 188 Exton, J.H. & Harper, S.C. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 519-532
- 189 Hutson, N.J., Brumley, F.T., Assimacopoulos, F.D., Harper, S.C. & Exton, J.H. (1976) J. Biol. Chem. 251, 5200-5208
- 190 Cherrington, A.D., Assimacopoulos, F.D., Harper, S.C., Corbin, J.D., Park, C.R. & Exton, J.H. (1976) J. Biol. Chem. 251, 5209-5218
- 191 Tolbert, M.E.M., Butcher, F.R. & Fain, J.N. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5686-5692
- 192 Rössle, M. (1975) Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Freiburg
- 193 Chen, R.F. (1967) J. Biol. Chem. 242, 173-181

- 194 Keilin, D. & Hartree, E.F. (1938) Proc. R. Soc. London Ser. B 124, 397-405
- 195 Wieland, O. & von Jagow-Westermann, B. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U. Ed.) Band 2 S. 1536-1537, Verlag Chemie, Weinheim Bergstraße
- 196 Krebs, H.A. & Henseleit, K. (1932) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33-66
- 197 Christiansen, R., Borreback, B. & Bremer, J. (1976) FEBS Lett. 62, 313-317
- 198 Ross, B.D. (1972) Perfusion Techniques in Biochemistry Clarendon Press, Oxford
- 199 Cornell, N.W., Lund, P., Hems, R., & Krebs, H.A. (1973) Biochem. J. 134, 671-672
- 200 Cornell, N.W., Lund, P. & Krebs, H.A. (1974) Biochem. J. 142, 327-337
- 201 Jaworek, D., Gruber, W. & Bergmeyer, H.U. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U. Ed.) Band 2 S. 2178-2181, Verlag Chemie, Weinheim/ Bergstraße
- 202 Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Möllering, H. & Pfeleiderer, G. *ibid* S. 1741-1745
- 203 Dagley, S. *ibid* S. 1607-1611
- 204 Garland, P.B. *ibid* S. 2029-2035
- 205 Lang, G. & Michal, G. *ibid* S. 1283-1287
- 206 Bernt, E. & Bergmeyer, H.U. *ibid* S. 1749-1753
- 207 Lund, P. *ibid* S. 1767-1769
- 208 Möllering, H. *ibid* S. 1636-1639
- 209 Bergmeyer, H.U. & Bernt, E. *ibid* S. 1624-1627
- 210 Czok, R. & Lamprecht, W. *ibid* S. 1491-1496
- 211 Czok, R. *ibid* S. 1469-1473
- 212 Mellanby, J. & Williamson, D.H. *ibid* S. 1887-1890
- 213 Lamprecht, W. & Trautschold *ibid* S. 2151-2160

- 214 Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F. & Stark, H.
ibid S. 1241-1246
- 215 Gutmann, I. & Bergmeyer, H.U. ibid S. 1839-1842
- 216 Williamson, D.H. & Mellanby, J. ibid S. 1883-1886
- 217 Wieland, O. & von Jagow-Westermann ibid S. 1530-1534
- 218 Entenman, C. (1957) in: Methods in Enzymology III
S. 299-317
- 219 Eggstein, M. & Kuhlmann, E. (1974) in : Methoden der
Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U. Ed.) S. 1871-
1878 , Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- 220 Böttger, I., Wieland, O., Brdiczka, D. & Pette, D.
(1969) Eur.J. Biochem. 8, 113-119
- 221 Bolender, R.P. & Weibel, E.R. (1973) J. Cell Biol.
56, 746-751
- 222 Scholz, R. & Bücher, T. (1965) in: Control of Energy
Metabolism (Chance, B., Estabrook, R.W. & Williamson,
J.R. Eds.) S. 393-414, Academic Press, New York &
London
- 223 Klingenberg, M. & Pfaff, E. (1966) in: Regulation of
Mitochondrial Metabolism (Tager, J.M., Papa, S.,
Quagliariello, E. & Slater, E.C. Eds.) S. 180-201
Elsevier, Amsterdam

LEBENS LAUF

Dietrich Brocks

geboren am 4. Juni 1950 in Kiel

Eltern: Prof.Dr.rer.nat. Karl Brocks

Ursula Brocks geborene Wiese

1957 bis 1960	Ernst Henning Schule Hamburg-Bergedorf
1960 bis 1961	Volksschule Wentorf
1961 bis 1969	Sachsenwaldschule Reinbek
Mai 1969	Abitur
WS 1969/70 bis WS 1971/72	Studium der Chemie an der Universität Hamburg
Februar 1972	Diplom-Vorprüfung
SS 1972 bis SS 1975	Studium der Chemie an der Universität München
Juni 1975	Diplom-Hauptprüfung
Sept. 1975 bis Aug. 1976	Diplomarbeit
Sept. 1976 bis Dez. 1978	Doktorarbeit in der Forscher- gruppe Diabetes unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. O. Wieland
September 1977	Eheschließung mit Mechtild Schmitt

